

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přirodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Kateřina Piňová

Využití rtuťových elektrod ke stanovení kyseliny tauroursodeoxycholové

The use of mercury electrodes to determine tauroursodeoxycholic acid

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Karolína Pecková, Ph.D.

Praha 2013

Tato bakalářská práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857.

Prohlázení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 4.9.2013

Chtěla bych především podkovat RNDr. Karolin Peckové, Ph.D. za odborné vedení, ochotu, dobré rady a trpělivost. Dále bych chtěla podkovat celé své rodině, příbuzným, kamarádům a přátelům za podporu během studia.

Abstrakt

Tato bakalářská práce je věnována studiu redukce kyseliny tauroursodeoxycholové (TUDCA) na rtuových elektrodách, a to na visící rtuové kapkové elektrodě a rtuové kapkové elektrodě, pomocí polarografických (diferenční pulsní polarografie (DPP), DC tast polarografie (DCTP)) a voltametrických (diferenční pulsní voltametrie (DPV), adsorpční rozpouštěcí diferenční pulsní voltametrie (AdS-DPV)) technik. TUDCA je konjugát kyseliny ursodeoxycholové s taurinem a používá se jako lék. Bylo zjištěno, že TUDCA poskytuje ve vodných roztocích jeden redukční pík (vlnu) a potenciál tohoto píku (polární potenciál) se pohybuje okolo $-0,1200$ V. Pro stanovení TUDCA je nejcitlivější použitou metodou DP voltametrie v prostředí $0,04$ mol.l⁻¹ borátového pufru o pH = 9,1. Oproti DPP, jejíž mez detekce je $3,17 \cdot 10^{-6}$ mol.l⁻¹ a mez stanovitelnosti $1,05 \cdot 10^{-5}$ mol.l⁻¹, má DPV řádově nižší mez detekce ($2,96 \cdot 10^{-7}$ mol.l⁻¹) i mez stanovitelnosti ($9,87 \cdot 10^{-7}$ mol.l⁻¹). Při použití metody AdS-DPV byla výška píku vyšší pouze o cca 20 %, tudíž tato metoda nebyla vyhodnocena jako dále analyticky přínosná pro toto měření. Pomocí cyklické voltametrie bylo zjištěno, že je tento redukční děj řízen adsorpcí a je quasi-reverzibilní; pravděpodobně je redukován proton sulfonové skupiny. Dále bylo zjištěno, že stanovení TUDCA neinterferuje se zinekatými kationty.

Abstract

This thesis is devoted to the study of reduction of Tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) on mercury electrodes - on the hanging mercury drop electrode and a mercury electrode, using polarographic (difference pulse polarography (DPP), direct current fast polarography (DCTP)) and voltammetric (difference pulse voltammetry (DPV), adsorptive stripping differential pulse voltammetry (AdS-DPV)) techniques. TUDCA is a conjugate of ursodeoxycholic acid and taurine, which is used as medication. It was discovered that TUDCA gives a single peak (wave) and the potential of this peak (half-wave potential) is about -1200 mV. The most sensitive method used was DP voltammetry, which has limit of detection $3,17 \cdot 10^{-66} \text{ mol.l}^{-1}$ and limit of quantification $1,05 \cdot 10^{-65} \text{ mol.l}^{-1}$, as it has a much lower limit of detection ($2,96 \cdot 10^{-67} \text{ mol.l}^{-1}$) and limit of quantification ($9,87 \cdot 10^{-67} \text{ mol.l}^{-1}$) than DP polarography. In applying AdS-DPV method the peak height was increased only by about 20 %, therefore this method was evaluated as analytically unbeneficial for this measurement. It was discovered that the methods used for the characterization of the electrode happening are controlled by adsorption and are quasi-reversible; probably is reduced proton of sulfonic group. Furthermore, it was discovered that TUDCA does not interfere with zinc cations.

P edm tová hesla:

- polarografie
- voltametrie
- flu idové kyseliny
- rtu idové elektrody

Klí idová slova:

- kyselina tauroursodeoxycholová
- DC tast polarografie
- cyklická voltametrie
- diferen ní pulzní polarografie
- rtu idová kapající elektroda
- visící rtu idová kapková elektroda

Obsah

1. Úvod.....	10
1.1. Cíl práce.....	10
1.2. Vlastnosti a využití kyseliny tauroursodeoxycholové.....	10
1.3. Taurin.....	12
1.4. Analytické metody stanovení TUDCA.....	12
1.5. Voltametrické a polarografické metody.....	13
1.6. Diferenční pulsní voltametrie, diferenční pulsní polarografie.....	13
1.7. DC tast polarografie.....	14
1.8. Adsorpční rozpouštěcí diferenční pulsní voltametrie.....	14
1.9. Cyklická voltametrie.....	14
2. Experimentální část.....	15
2.1. Chemikálie.....	15
2.2. Aparatura.....	16
2.3. Použití pracovní elektrody.....	16
2.3.1. Rtuťová kapková elektroda (DME).....	16
2.3.2. Visící rtuťová kapková elektroda (HMDE).....	17
2.4. Vyhodnocení výsledků.....	17
2.5. Pracovní postupy.....	17
3. Výsledky a diskuze.....	18
3.1. Diferenční pulsní polarografie a DC tast polarografie TUDCA.....	18
3.2. Diferenční pulsní voltametrie TUDCA.....	25
3.3. Adsorpční rozpouštěcí diferenční pulsní voltametrie TUDCA.....	30
3.4. Charakteristika elektrodového děje.....	32
3.4.1. Cyklická voltametrie.....	32
3.4.2. Charakter limitních proudů v DC tast polarografii.....	35
3.4.3. Porovnání elektrochemické redukce TUDCA a lanosterolu.....	36
3.4.4. Studium vlivu přítomnosti Zn^{2+} na stanovení TUDCA.....	37
4. Závěr.....	41
5. Literatura.....	42

Seznam zkratk

AdS-DPV ó adsorp ní rozpou-t cí diferen ní pulsní voltametrie

BR pufr ó Britton vóRobinson v pufr

c ó koncentrace

CV ó cyklická voltametrie

DPP ó diferen ní pulzní polarografie

DPV ó diferen ní pulzní voltametrie

DCTP ó DC tast polarografie

E ó potenciál

E_p ó potenciál píku

I ó proud

I_{lim} ó limitní proud

I_p ó vý-ka píku

I_{pA} ó vý-ka anodického píku

I_{pK} ó vý-ka katodického píku

LOQ ó mez stanovitelnosti

LOD ó mez detekce

pH ó záporný dekadický logaritmus oxoniových iont

TUDCA ó kyselina tauroursodeoxycholová

1. Úvod

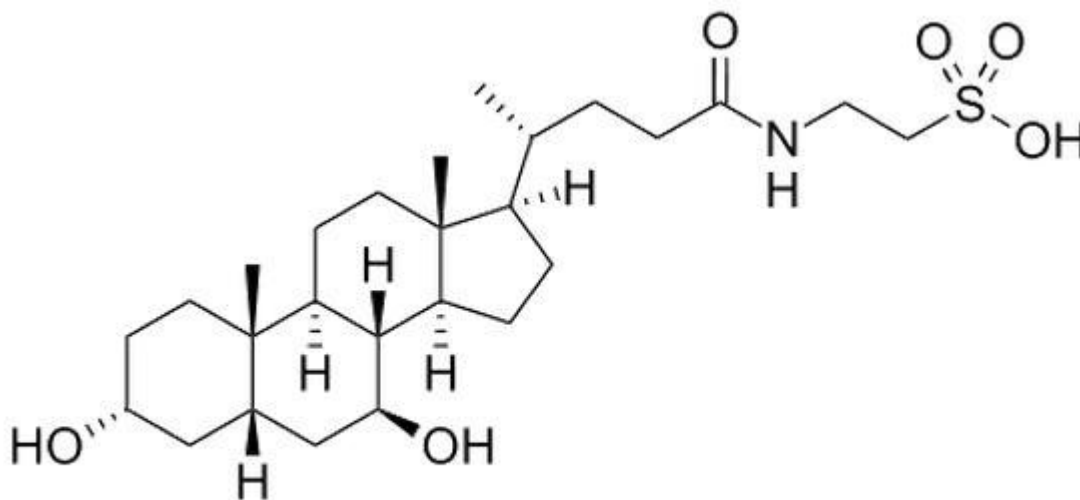
1.1 Cíle práce

Cílem předkládané bakalářské práce bylo zjistit, zda lze kyselinu tauroursodeoxycholovou redukovat polarografickými resp. voltametrickými metodami na rtuových elektrodách a v jakém koncentračním rozmezí ji lze stanovit konkrétní metodou. Byly vyzkoušeny metody diferenční pulsní polarografie (DPP), adsorpční rozpouštěcí diferenční pulsní voltametrie (AdS-DPV), diferenční pulsní voltametrie (DPV) a DC tast polarografie (DCTP).

Dalším cílem této práce bylo prostudovat elektrochemický děj probíhající na elektrodě pomocí cyklické voltametrie na visící rtuové kapkové elektrodě (HMDE).

1.2 Vlastnosti a využití kyseliny tauroursodeoxycholové

Čistá kyselina tauroursodeoxycholová (TUDCA) je za laboratorních podmínek bílá, jemná, krystalická látka, která je dobře rozpustná ve vodě. Strukturní vzorec a další vybrané charakteristiky jsou shrnuty na obr. 1.



IUPAC name: 2-[[*(4R)*-4-[[*(3R,5S,7S,8R,9S,10S,13R,14S,17R)*-3,7-dihydroxy-10,13-dimethyl-2,3,4,5,6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-tetradecahydro-1*H*-cyclopenta[*a*]phenanthren-17-yl]pentanoyl]amino]ethanesulfonic acid

CAS number: 14605-22-2

Sumární vzorec: $C_{26}H_{45}NO_6S$

Molekulová hmotnost: 499,70 g.mol⁻¹

pK_A: 1,5

Obr. 1

Strukturní vzorec a vybrané vlastnosti TUDCA.

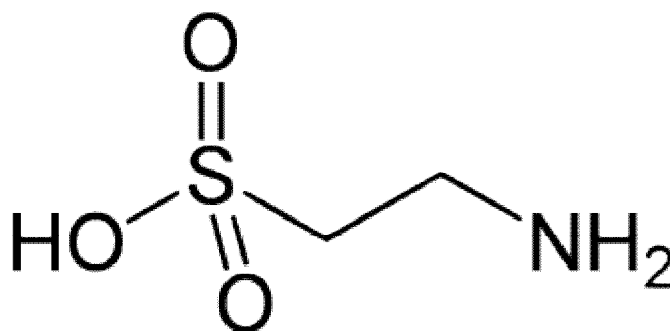
Kyselina tauroursodeoxycholová (dále jen TUDCA) je žlučová kyselina, která se vyskytuje jako jedna z hlavních žlučových kyselin u medvěda. Medvědí žluč, žlučový extrakt a žlučník jsou používány v tradiční čínské medicíně již po tisíce let. TUDCA byla poprvé syntetizována z kyseliny cholové v roce 1954 v Japonsku. Dnes je TUDCA schválena v mnoha zemích k léčbě onemocnění jater a pro rozpouštění žlučových kamenů. U lidí je dobře snášena. Nejčastěji nefádným účinkem je průjem projevující se u méně než 2% populace testovaných. Další schválené použití TUDCA je při léčbě jaterní cholestázy, zejména primární biliární cirhózy (PBC) [1]. Hydrofilní žlučová kyselina TUDCA je cytoprotektivní při mnoha onemocněních, jako například u Huntingtonovy choroby, Parkinsonovy choroby nebo u některých očních onemocněních jako je šedý zákal, degenerace sítnice nebo glaukom [1, 2, 3, 4]. Má navíc anti-apoptotické vlastnosti [3]. Dále zabírá produkci reaktivních forem kyslíku a působí tedy jako antioxidant [2]. Přesný mechanismus účinku TUDCA na molekulární úrovni ale není plně objasněn [1].

Žlučové kyseliny jsou biosyntetizovány z cholesterolu v jaterních hepatocytech a jsou uloženy ve žlučníku nebo jsou přítomny v enterohepatálním oběhu. V lidské žluči jsou nejvíce zastoupeny kyselina cholová (31 %) a kyselina chenodeoxycholová (45 %). Jsou to povrchově aktivní molekuly s amfipatickým charakterem, což znamená, že mají hydrofobní stranu, která neobsahuje řádné substituenty a hydrofilní stranu obsahující hydroxylové skupiny [5]. Žlučové kyseliny jsou v organismech v tětinou konjugované

s glycinem nebo taurinem, což umožňuje jejich ionizaci v rozsahu hodnot pH běžných v tenkém stěvu [1]. TUDCA je konjugát kyseliny ursodeoxycholové (UDCA) a taurinu [3] a díky vysoké rozpustnosti taurinu ve vodě je to látka hydrofilní [1]. Kritická micelární koncentrace TUDCA je $2 \cdot 10^{-63} \text{ mol.l}^{-1}$ v $0,15 \text{ mol.l}^{-1}$ chloridu sodném [6].

1.3 Taurin

Taurin je semi-esenciální aminokyselina a na rozdíl od ostatních beta-aminokyselin, taurin není strukturální součástí kvartérních proteinů nebo peptidů. Podobá se spíše peptidovým neurotransmiterům jako jsou adrenalin nebo dopamin, než klasickým bílkovinám ve stravě [7]. Taurin je vysoce rozpustný ve vodě ($10,48 \text{ g} / 100 \text{ ml}$), a strukturálně je amino skupina připojena k sulfonové skupině pomocí ethylu. Předpokládá se, že je v těle v důležitých koncentracích, avšak vyšší koncentrace taurinu se vyskytují v srdeční tkáni nebo například ve varlatech [8]. Strukturální vzorec taurinu je na obr. 2.



Obr. 2

Strukturální vzorec taurinu

1.4 Analytické metody stanovení TUDCA

TUDCA dosud nebyla studována polarografickými ani voltametrickými metodami, nicméně byly studovány jiné fluórové kyseliny a jejich konjugáty, které poskytly redukční pík v oblasti vysoce záporných potenciálů [9]. TUDCA byla již stanovována pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí v lidské plazmě [10].

1.5 Voltametrické a polarografické metody

Voltametrie a polarografie jsou metody, při nichž se sleduje závislost proudu procházejícího pracovní elektrodou ponořenou v analyzovaném roztoku na potenciálu, který se na tuto elektrodu vkládá z vnějšího zdroje a sásem se mění (např. lineárně sásem roste nebo klesá) [11, 12]. V roztoku, ve kterém není látka, která by se oxidovala nebo redukovala, je pracovní elektroda zpolarizována a netečí jí proud, avšak pokud jev roztoku látka která se při určitém potenciálu oxidační nebo redukuje, dojde k depolarizaci elektrody a proud jí teče. Tyto látky se nazývají depolarizátory [12].

Naměřenou závislostí je tzv. polarizační křivka a analytickým signálem je velikost proudu, který prochází při vhodném potenciálu elektrodou v přítomnosti analytu. Tuto závislost proudu na elektrodovém potenciálu lze měřit buď v ustáleném stavu, nebo při nestacionárních podmínkách [11]. Měření lze provádět pomocí dvou uspořádání, a to dvouelektrodového, kde se měří za pomoci pracovní elektrody a referenční elektrody, a třeelektrodového, kde je káánek doplněn o pomocnou elektrodu. Název polarografie se používá pouze při použití rtuťové kapající elektrody k měření a to z historických důvodů [12].

1.6 Diferenční pulsní voltametrie (DPV) a diferenční pulsní polarografie (DPP)

Největší význam z pulsních metod v praktické analytické chemii dnes mají diferenční pulsní voltametrie a polarografie [11]. Na elektrodu se při těchto metodách vkládá potenciál poněkud složitějšího průběhu [12]. Na sásem se měřící potenciál se vkládá např. ový impuls o malé amplitudě 10-100 mV, který trvá v řádech milisekund. Proud je měřen těsně před vložení impulsu a na jeho konci, těsně před koncem doby flivota kapky [13, 11]. Voltametrická resp. polarografická křivka má tvar píku [12]. Poloha píku na potenciálové ose udává kvalitativní informaci, stejně jako potenciál a jeho výška je analogií limitního proudu, který závisí na koncentraci látky v roztoku [11]. Touto metodou lze stanovovat nízké koncentrace analytů a lze vedle sebe stanovovat i látky lišící se podstatně v potenciálních potenciálech nejen při DC testu polarografií nebo DC voltametrií [12].

1.7 DC tast polarografie (DCTP)

Jeden ze způsobů provedení polarografie (voltametrie) je vkládání sásem pouze rostoucího nebo klesajícího potenciálu na elektrodu a pak se tato metoda jmenuje DC polarografie [12]. Rychlost změny potenciálu musí být dostatečně malá ve srovnání s ustavováním rovnováhy u elektrody, aby tato metoda považovat za stacionární při konstantním potenciálu [11]. Dojde-li k depolarizaci elektrody oxidací nebo redukcí stanovované látky, naměříme tzv. polarografickou křivku [12]. Přítomnost analytu se na této křivce projeví polarografickou vlnou, jejíž limitní proud odpovídá koncentraci stanovované látky a potenciál tuto látku charakterizuje [11]. Při metodě DC polarografie je proud měřen jen krátkou dobu (ms) těsně před odkápnutím kapky a drží se v paměti po většinu doby flivota následující kapky až do okamžiku dalšího měření [12].

1.8 Adsorpční rozpouštěcí diferenční pulsní voltametrie (AdS-DPV)

Metoda AdS-DPV je založena na adsorpci látky s povrchově aktivními vlastnostmi na elektrodě při určitém potenciálu [14]. Pokud jsou tyto látky elektrochemicky aktivní, lze je poté oxidovat nebo redukovat a z výšky píku stanovit jejich koncentraci. Pokud však aktivní nejsou, tak se při dosažení určitého potenciálu desorbují. Desorbce látky se projeví tzv. tenzametrickým píkem, který odpovídá kapacitnímu proudu procházejícímu elektrodou při změně kapacity elektrické dvojvrstvy při desorpci [11]. Tato metoda je velmi důležitá pro stopové analýzy iontů kovů, při kterých ty, které nejdou nakoncentrovat elektrolyticky, se převádí na stanovitelné komplexy s organickými sloučeninami [14, 11].

1.9 Cyklická voltametrie (CV)

Cyklická voltametrie je metoda při níž se na stacionární kapku v nemíchaném roztoku vkládá potenciál trojúhelníkového průběhu. Polarizační křivky mají tvar píku a proud píku závisí na rychlosti časové změny potenciálu [11]. Tato metoda se spíše využívá pro studium oxidačně-redukčních procesů, pochopení meziproduktů reakce

nebo pro získání stability reakčních produktů; pro kvantitativní stanovení je používána ovšem jen zídka. [13]. Zprůměru katodických a anodických kivek je také možno usuzovat na reverzibilitu studovaného děje. Její podmínkou je podíl velikosti proudů anodického a katodického píku roven jedné, a rozdíl potenciálů obou píků $\Delta E_p = 0,059/n$, kde n je počet vyměňovaných elektronů. Dále můžeme určit z tvaru závislosti výšky píku na rychlosti polarizace, zda děj odehrávající se na elektrodě je kontrolovaný difúzí nebo adsorpcí [11].

2. Experimentální část

2.1 Chemikálie

Pro přípravu zásobního roztoku ($1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$), byla použita TUDCA (>97%, Merck Millipore, Drážbany, Německo) a deionizovaná voda (Milli-Q_{plus} system, Millipore, USA), pro přípravu zásobního roztoku lanosterolu ($1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$) lanosterol (>93%, Sigma-Aldrich, USA) a methanol čistoty p.a. (Lachner, Neratovice, ČR) a jako roztok zinečnatých iontů ($1 \cdot 10^{-2} \text{ mol.l}^{-1}$) byl použit chlorid zinečnatý v deionizované vodě (Milli-Q_{plus} system, Millipore, USA). Pro Brittona-Robinsonův pufr byl použit hydroxid sodný (p.a. Penta, Chrudim, ČR), kyselina fosforečná (p.a., Lachema, Brno, ČR), kyselina octová (98%, Lachema, Brno, ČR) a kyselina boritá (p.a., Penta, Chrudim, ČR), každá o koncentraci $0,04 \text{ mol.l}^{-1}$. K výrobě octanového pufru kyselina octová a octan sodný trihydrát (p.a. Lachner, Neratovice, ČR). Fosfátový pufr byl připraven z monohydrátu dihydrogenfosforečnanu sodného (98%, Aldrich, USA) a dodekahydrátu fosforečnanu disodného (Lachner, Neratovice, ČR). Borátový pufr obsahoval tetraboritan disodný dekahydrát (p.a., Lachema, Brno, ČR) a kyselinu boritou (p.a. PENTA, Chrudim, ČR).

2.2 Aparatura

Všechna provedená elektrochemická měření byla realizována na přístroji Eco-Tribo polarograf řízeným počítačem se softwarem Polar Pro verze 5.1 (Polaro-Sensors, R, Praha). Měření bylo provedeno v tříelektrodovém zapojení. Jako pomocná elektroda byla použita drátková platinová elektroda, jako referentní elektroda argentchloridová (3 mol.l⁻¹ KCl, Monokrystaly, Turnov, R) a jako pracovní elektrody byly použity kapající rtuťová elektroda (DME) a tuflková visící rtuťová kapková minielektroda typu UM μ E (Polaro-Sensors, Praha, R). K přípravě pufru o přesném pH, byl použit pH metr Jenway (Staffordshire, UK). Pro odvážení přesných hmotností byly používány analytické váhy zn. Sartorius 2004 MP.

2.3 Použité pracovní elektrody

2.3.1 Rtuťová kapková elektroda

Rtuťová kapková elektroda (DME) byla používána při měření metodami DP polarografie a DC tast polarografie. Při práci s DME byla rychlost polarizace nastavena na 4 mV.s⁻¹, výška pulzu na 650 mV a šířka pulzu 80 ms. Rezervoár rtuti byl ve výšce 53 cm; měno od ústí kapiláry po hladinu rtuti v rezervoáru. Doba kapky při této výšce rezervoáru byla měna při nulovém vloženém napětí proti 3 mol.l⁻¹ argentchloridové elektrodě. Ústí kapiláry bylo ponořeno do předem zváženého roztoku 0,1 mol.l⁻¹ chloridu draselného s malým množstvím rtuti a byl měno odpadnutí dvaceti kapek rtuti. Po 107 sekundách a odpadnutí daného množství kapek rtuti, byla nádobka znovu zvážena. Z těchto údajů byla vypočtena proudková rychlost v , hmotnost m , čas t a plocha S jedné kapky viz tab. 1.

Tab. 1

Konstanty rtuťové kapkové elektrody při výšce rezervoáru 53 cm.

m (g)	v (g.s ⁻¹)	t (s)	S (cm ²)
0,0169	$3,16 \cdot 10^{-63}$	5,4	0,0547

2.3.2 Visící rtuťová kapková elektroda

Tuflková visící rtuťová kapková minielektroda typu UM μ E (Polaro-Sensors, Praha, ČR) byla použita pomocí metodami DP voltametrie a AdS-DP voltametrie. Rychlost nárůstu potenciálu byla 20 mV.s⁻¹. Výška pulzu byla nastavena na 650 mV a šířka pulzu na 80 ms. Podobně jako pro rtuťovou kapkovou elektrodu bylo ústí kapiláry ponořeno do zvážené nádoby s roztokem 0,1 mol.l⁻¹ chloridu draselného s trochou rtuti a při nulovém vloženém potenciálu proti 3 mol.l⁻¹ argentchloridové referenční elektrodě nakapáno do roztoku 30 kapek rtuti a vypočtena hmotnost jedné kapky $m = 1,407 \cdot 10^{-3}$ gramu a její plocha $S = 0,0107 \text{ cm}^2$.

2.4 Vyhodnocení výsledků

Vyhodnocování výšek pík a limitních proudů pro metody DP polarografie, DP voltametrie, DC tast polarografie, AdS-DP voltametrie a cyklická voltametrie bylo učiněno v programu Polar Pro 5.1 (Polaro-sensors, Praha, ČR). Pro výšky pík byla použita metoda prodloužení linie základního elektrolytu před nástupem píku (cyklická voltametrie) a pro DP polarografie, DP voltametrie a AdS-DP voltametrie byla použita metoda spojení minim po obou stranách píku. Pro limitní proudy byla použita metoda prodloužení spodní a horní linie vlny a odečtení limitního proudu v místě polivného potenciálu.

2.5 Pracovní postupy

Zásobní roztok TUDCA o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$, byl připraven do 100 ml odměrné baňky, uchováván v lednici a kvůli prevenci fotodestrukce obalen alobalem. BR pufrů různých pH byl připravován na pH metru ze zásobních roztoků kyselých a zásaditých složek. Zásaditá složka sestává z 0,2 mol.l⁻¹ hydroxidu sodného a kyselá složka z kyseliny fosforečné, kyseliny octové a kyseliny borité, každá o koncentraci 0,04 mol.l⁻¹. Příprava 0,04 mol.l⁻¹ borátového pufru spočívala v odvážení dekahydrátu

tetraboritanu disodného, jeho rozpúšťanie v deionizovanej vode a titrace nasyceným roztokom kyseliny boritej do $\text{pH} = 9,1$ a doplnenie deionizovanou vodou za stále kontroly pH . $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$. Octanový pufr o požadovanom $\text{pH} = 4,4$ bol pripravený odvážením trihydrátu octanu sodného, odpipetovaním kyseliny octovej a doplnenie deionizovanou vodou. Na $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ fosfátový pufr o $\text{pH} = 7,1$ bol rozpusten monohydrát dihydrogenfosforenanu sodného a dodekahydrát fosforenanu disodného a jako rozpúšťadlo bola použita deionizovaná voda.

Jednotlivé merené roztoky boli pripravované do 10 ml odmernej banky. Vždy bolo odpipetované požadované množstvo zásobní roztoku do odmernej banky a doplneno poriešok roztokom základného elektrolytu. Pred nádobku bola umiestnená promývačka s deionizovanou vodou. Všetchny elektrody, promývačka a miešátko boli pred vložením do roztoku dôkladne omyté deionizovanou vodou. Pred začatím každého merenia bol z mereného roztoku, pomocou dusíku prievádneho z tlakovej lahve po dobu pár minút odstránený kyslík. Potom boli zaznamenávané polarografické resp. voltametrické krivky a celou dobu merenia bol dusík prievádzaný nad roztok. Pri merení metódou AdS-DP voltametrie bolo jako u jedinej možnosti akumulácie s roztokom miešané a po skončení akumulácie bolo miešanie vypnuté a teprve po 5 sekundách provedeno merenie.

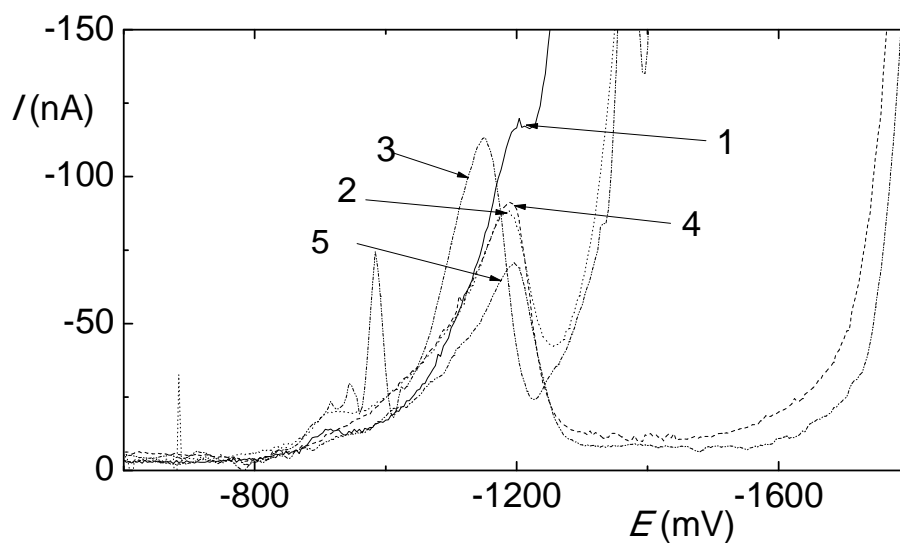
3. Výsledky a diskuze

3.1 Diferenční pulsní polarografie a DC test polarografie TUDCA

Byl studován vliv pH a pufru na chování TUDCA při DP polarografii a DC test polarografii v roztoku BR pufru (pH 3,0; 4,0; 5,0; 9,0; 12,0), $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ fosfátového pufru (pH 7,1), $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ octanového pufru (pH 4,4) a $0,04 \text{ mol.l}^{-1}$ borátového pufru o (pH 9,1). TUDCA se vzhledem k $\text{pK}_a = 1,5$ v roztocích vyskytuje především v nedisociované formě. Koncentrace TUDCA v roztoku byla vždy $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$. Z DP polarogramu (obr. 3, obr. 4) a DC test polarogramu (obr. 5) vyplývá, že TUDCA poskytuje v prostředí použitých pufrů jeden pík i vlnu; její hodnoty a hodnoty potenciálu jsou pro DP a DC test polarografii uvedeny v tab. 2 a tab. 3. Zvýšující se pH nemá nijak významný vliv na polohu píku, stejně jako složení pufru. Potenciál i potenciál píku je v rozmezí $0,190 \pm 30 \text{ mV}$.

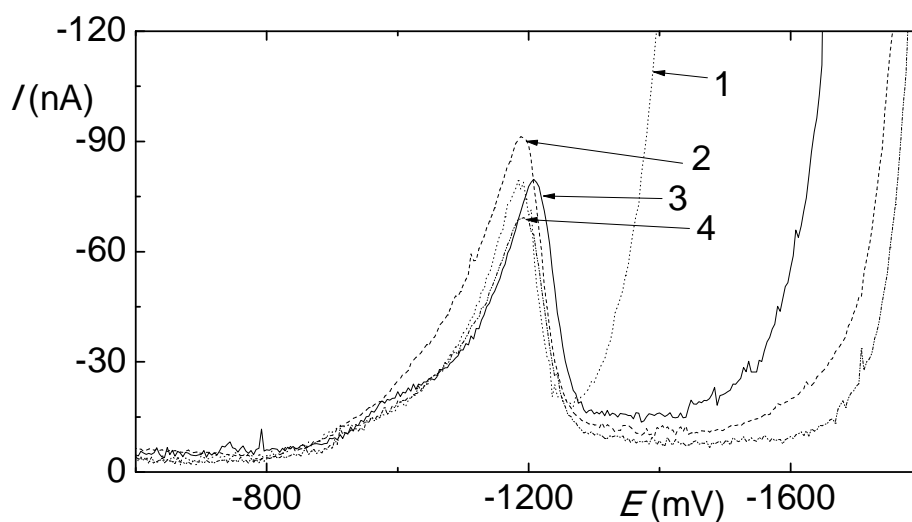
Jako vhodný pro další měření, byl vyhodnocen 0,04 mol.l⁻¹ borátový pufr o pH = 9,1, jelikož poskytuje dostatečně velké potenciálové okno pro vyhodnocení, výšky piku I_p v borátovém pufru se od výšky piku I_p v BR pufru o odpovídajícím pH = 9,0 liší pouze o cca 20% a zároveň je jeho příprava finančně méně náročná a snadnější než příprava BR pufru. V 0,04 mol.l⁻¹ borátovém pufru o pH = 9,1, byly měny koncentrační závislosti metodou DP polarografie v rozmezí koncentrací 1.10⁻⁶ až 6.10⁻⁶ mol.l⁻¹ TUDCA a metodou DC tast polarografie v rozmezí 1.10⁻⁶ až 2.10⁻⁵ mol.l⁻¹ TUDCA. Naměřené polarogramy pro obě metody jsou znázorněny na obr. 6, respektive obr. 9. V uvedených koncentračních rozmezích jsou obě závislosti lineární, jak je zřejmé z obr. 7 a obr. 10 (kalibrační závislosti pro DP polarografii a DC tast polarografii) a z jejich parametrů uvedených v tab. 4. V této tabulce jsou uvedeny hodnoty meze stanovitelnosti a meze detekce, které jsou pro metodu DPP v koncentračním řádu 10⁻⁶ mol.l⁻¹, opakovatelnost vyjádřená směrodatnou odchylkou s byla 0,5984 ($n = 10$). Mez detekce byla počítána jako koncentrace, která odpovídá trojnásobku směrodatné odchylky s výšky piku nejnižší měřitelné koncentrace: $LOD = 3s/b$, kde b je směrnice kalibrační závislosti. Mez stanovitelnosti byla počítána jako koncentrace, která odpovídá desetinásobku směrodatné odchylky s výšky piku nejnižší měřitelné koncentrace: $LOQ = 10s/b$, kde b je směrnice kalibrační závislosti. Pro metodu DC tast polarografie nebyly LOD a LOQ vyhodnocovány, protože jak je zřejmé z polarogramu, DC tast polarografie je mnohem méně citlivá než pulsní metody a k ověření nejnižších koncentrací byly obtížně vyhodnotitelné.

Se vzrůstající koncentrací TUDCA dochází k posunu potenciálu piku k negativnějším hodnotám, celkový posun je pro DP polarografii ca 680 mV, jak je zřejmé z obr. 8. Tento posun byl pozorován pro DP polarografii dalších fluových kyselin, které nebyly konjugovány s aminokyselinou (kyselina cholová, deoxycholová, chenodeoxycholová, lithocholová) a souvisí s adsorpcí fluových kyselin na povrch elektrody [9]. Nejnižší studované koncentrace v této studii byly 6.10⁻⁶ mol.l⁻¹, což je v souladu s DP polarografií TUDCA.



Obr. 3

DP polarogramy pro TUDCA ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) měřené v prostředí BR pufru o
 (1) pH = 3,0; (2) pH = 4,0; (3) pH = 5,0; (4) pH = 9,0; (5) pH = 12,0.



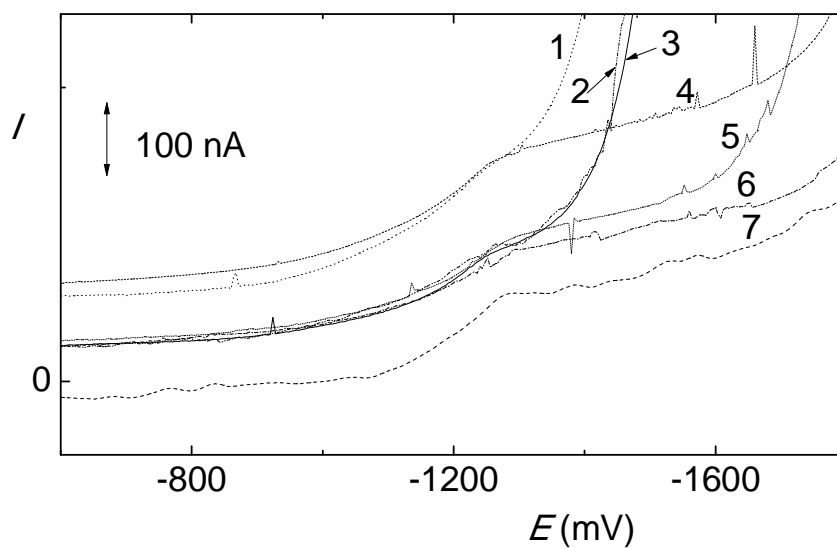
Obr. 4

DP polarogramy pro TUDCA ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) v prostředí (1) 0,1 mol.l⁻¹ octanový
 pufr o pH = 4,4; (2) BR pufr o pH = 9,0; (3) 0,1 mol.l⁻¹ fosfátový pufr o pH = 7,1; (4)
 0,04 mol.l⁻¹ borátový pufr o pH = 9,1.

Tab.2

Vliv pH a složení pufru na výšku píku a potenciál píku TUDCA ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$), měřeno metodou DP polarografie.

pufr	pH	I_p (nA)	E_p (mV)
0,04 mol.l ⁻¹ borátový pufr	9,1	663,6	61190,7
0,1 mol.l ⁻¹ fosfátový pufr	7,1	667,8	61205,7
0,1 mol.l ⁻¹ octanový pufr	4,4	667,9	61185,7
BR pufr	3,0	-	-
BR pufr	4,0	662,0	61186,7
BR pufr	5,0	663,5	61197,0
BR pufr	9,0	681,6	61191,0
BR pufr	12,0	682,1	61183,0



Obr. 5

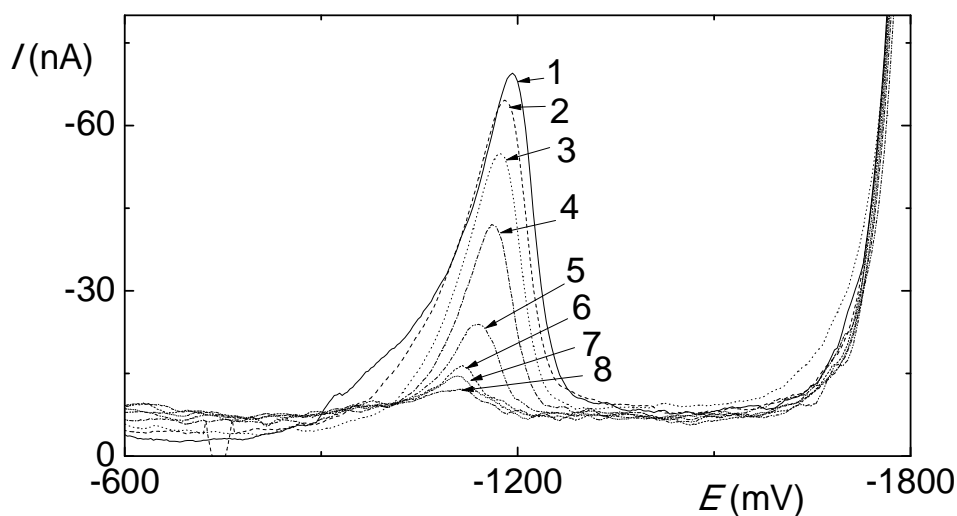
DC tast polarogramy pro TUDCA ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) měřené v prostředí různých pufrů :

(1) BR pufr o pH = 4,0; (2) 0,1 mol.l⁻¹ octanový pufr o pH = 4,4; (3) BR pufr o pH = 5,0; (4) BR pufr o pH = 9,0; (5) 0,1 mol.l⁻¹ fosfátový pufr o pH = 7,1; (6) 0,04 mol.l⁻¹ borátový pufr o pH = 9,1; (7) BR pufr o pH = 12,0.

Tab.3

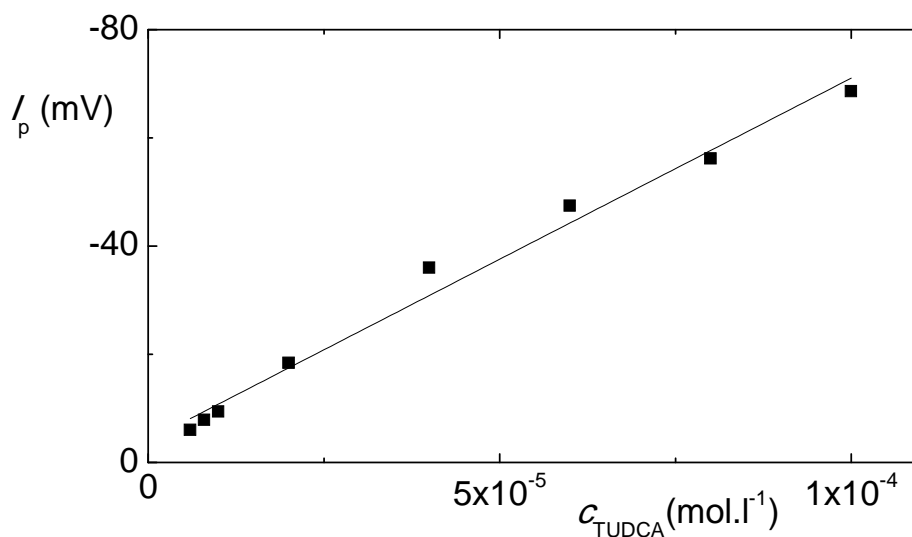
Vliv pH a složení pufru na limitní proud I_{lim} a polovalnový potenciál $E_{1/2}$ TUDCA ($c = 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$), měřeno metodou DC test polarografie.

pufr	pH	I_p (nA)	E_p (mV)
0,04 mol.l ⁻¹ borátový pufr	9,1	683,5	61160,3
0,1 mol.l ⁻¹ fosfátový pufr	7,1	6112,1	61206,7
0,1 mol.l ⁻¹ octanový pufr	4,4	6109,6	61170,0
BR pufr	4,0	6167,0	61155,0
BR pufr	5,0	668,7	61125,0
BR pufr	9,0	6146	61127,3
BR pufr	12,0	691,5	61191,3



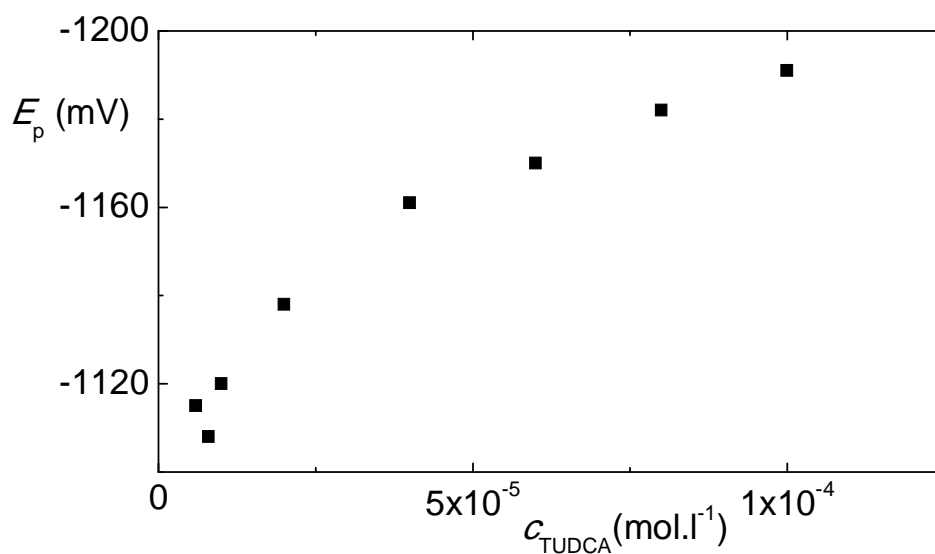
Obr. 6

DP voltamogramy TUDCA v rozmezí koncentrace $1 \cdot 10^{-6}$ až $6 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ v prostředí 0,04 mol.l⁻¹ borátového pufru o pH = 9,1. Koncentrace (mol.l⁻¹): (1) $1 \cdot 10^{-6}$; (2) $8 \cdot 10^{-6}$; (3) $6 \cdot 10^{-6}$; (4) $4 \cdot 10^{-6}$; (5) $2 \cdot 10^{-6}$; (6) $1 \cdot 10^{-6}$; (7) $8 \cdot 10^{-6}$; (8) $6 \cdot 10^{-6}$.



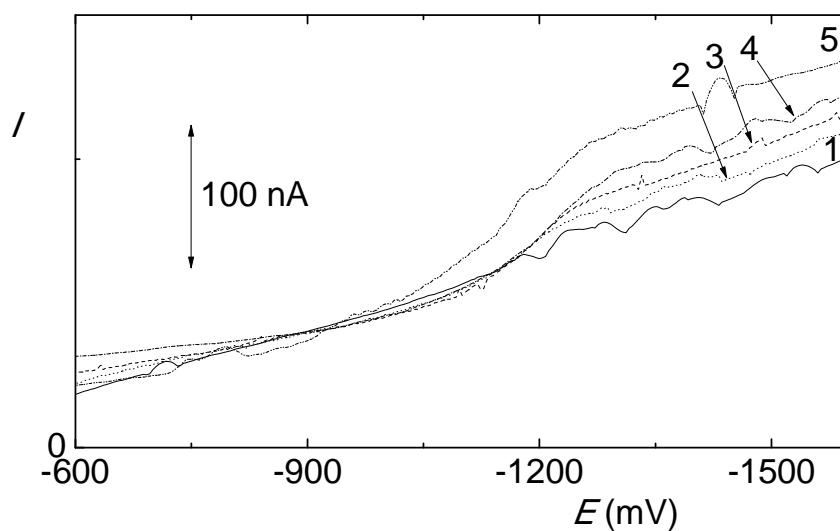
Obr. 7

Závislost výšky píku I_p na koncentraci TUDCA, pro metodu DP polarografie v prostředí 0,04 mol.l⁻¹ borátového pufru o pH = 9,1.



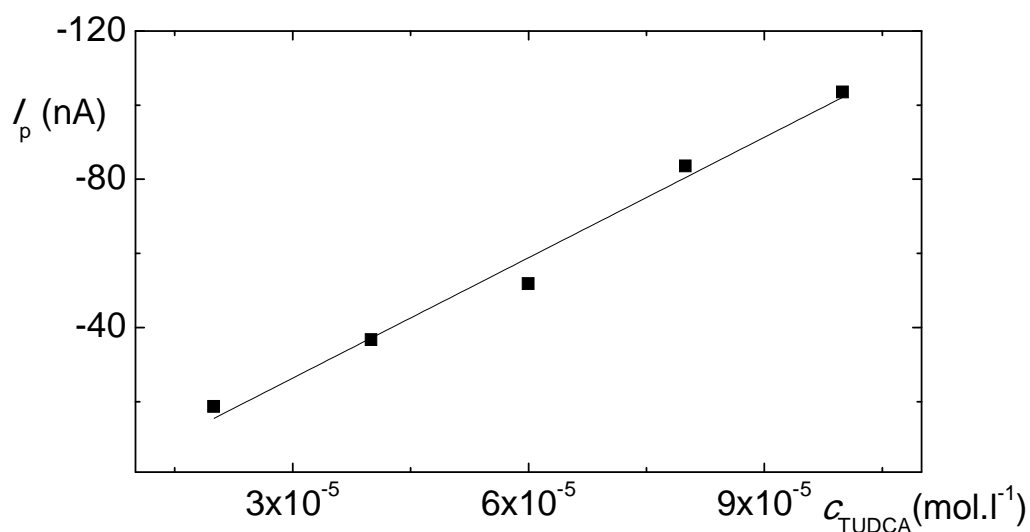
Obr. 8

Závislost potenciálu píku E_p na koncentraci TUDCA pro metodu DP polarografie v prostředí 0,04 mol.l⁻¹ borátového pufru o pH = 9,1.



Obr. 9

DC test polarogramy TUDCA v rozmezí koncentrací $1 \cdot 10^{-6}$ až $2 \cdot 10^{-5}$ mol.l⁻¹ v prostředí 0,04 mol.l⁻¹ borátového pufru o pH = 9,1. Koncentrace TUDCA: (1) $2 \cdot 10^{-6}$ mol.l⁻¹; (2) $4 \cdot 10^{-6}$ mol.l⁻¹; (3) $6 \cdot 10^{-6}$ mol.l⁻¹; (4) $8 \cdot 10^{-6}$ mol.l⁻¹; (5) $1 \cdot 10^{-5}$ mol.l⁻¹.



Obr. 10

Závislost limitního proudu I_{lim} na koncentraci TUDCA v rozmezí $1 \cdot 10^{-6}$ až $2 \cdot 10^{-5}$ mol.l⁻¹ měněnou metodou DC test polarografie v prostředí 0,04 mol.l⁻¹ borátového pufru o pH = 9,1.

Tab.4

Parametry kalibračních p ímek pro polarografické metody stanovení vý-ky píku TUDCA v prost edí 0,04 mol.l⁶¹ borátového pufru o pH = 9,1 a hodnoty meze detekce a meze stanovitelnosti.

metoda	úsek (nA)	sm rnice (nA.l.mol ⁶¹)	korela ní koeficient	LOD (mol.l ⁶¹)	LOQ (mol.l ⁶¹)
DP					
polarografie	64,1 ± 1,7	(66,7 ± 0,3).10 ⁵	0,9934	3,17.10 ⁶⁶	1,05.10 ⁶⁵
DC tast					
polarografie	6,1 ± 5,1	(61,1 ± 0,8).10 ⁶	0,9925	-	-

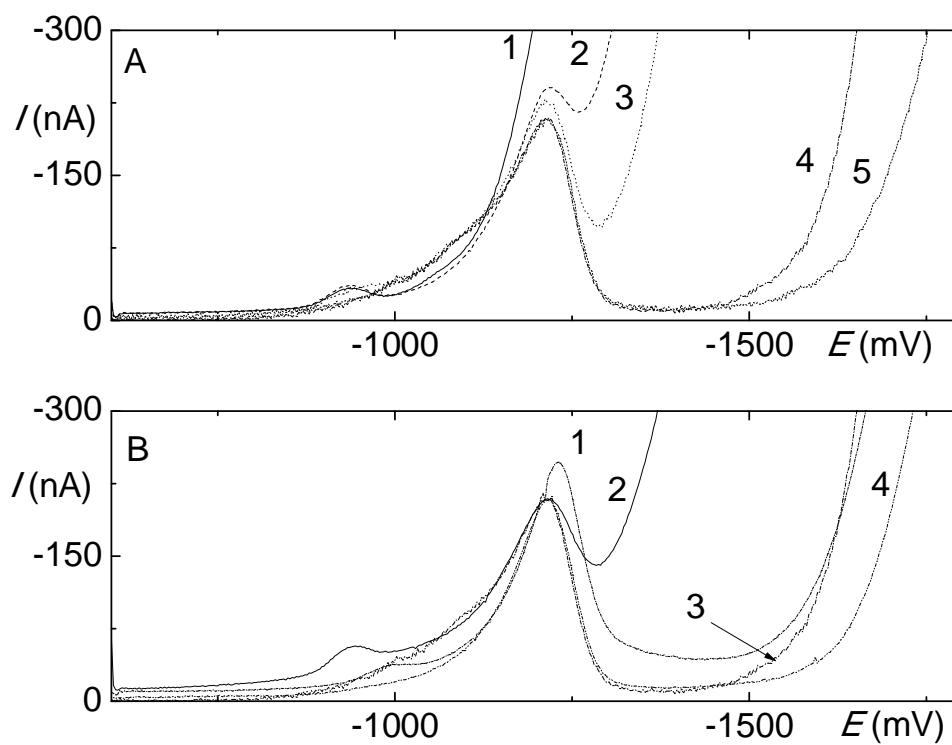
3.2 Diferen ní pulsní voltametrie TUDCA

Stejn ě jako p í polarografických studiích byl nejprve studován vliv pH a pufru na chování TUDCA p í DP voltametrii v roztoku BR pufru (pH 3,0; 4,0; 5,0; 9,0; 12,0), 0,1 mol.l⁶¹ fosfátového pufru (pH 7,1), 0,1 mol.l⁶¹ octanového pufru (pH 4,4) a 0,04 mol.l⁶¹ borátového pufru (pH 9,1). Koncentrace TUDCA v roztoku byla 1.10⁶⁴ mol.l⁶¹. Nam ěné DP voltamogramy pro BR pufr y jsou zobrazeny na obr. 11 (A) a pro ostatní pufr y na obr. 11 (B). Podobn ě jako p í m ění metodou DP polarografie poskytuje TUDCA v r zných pufrech jeden p ík o r zné vý-ce. Hodnoty vý-ek p ík a hodnoty jejich potenciálu jsou uvedeny v tab. 5. Z uvedených hodnot potenciálu píku v rozmezí 1220 ± 8 mV a vý-ky píku v rozmezí 211 ± 20 nA je z ejmé, ě jejich rozptyl je men-í neě pro DP polarografii. Pro BR pufr o pH = 3,0 nebyl p ík TUDCA zaznamenán kv ěli z úělení potenciálového okna na katodické stran ě, zp sobenému vylu ováním vodíku p í kladn ějších potenciálech, coě je d sledek vý-í koncentrace H⁺ iont ě v kyselém prost edí.

Jako vhodný pufr byl op ět vybrán 0,04 mol.l⁶¹ borátový pufr o pH = 9,1, jelikoě má dostate n velké potenciálové okno a jeho p íprava je snaz-í a mén ě náro ná neě p íprava BR pufru o odpovídajícím pH = 9,0, ve kterém byla vý-ka píku TUDCA

($c = 1 \cdot 10^{64} \text{ mol.l}^{61}$) vyší jen o necelá 2%. Nejvyšší pík vykazovala TUDCA p i m ení v BR pufru o $\text{pH} = 4,0$, ale vzhledem k úzkému potenciálovému oknu byl pík h e vyhodnotitelný.

Kalibra ní závislost TUDCA byla m ena v rozmezí koncentrací $1 \cdot 10^{64}$ a $6 \cdot 10^{67} \text{ mol.l}^{61}$ a voltamogramy nam ené pro tuto závislost jsou znázorn ny na obr. 12 a obr. 13 (nejnižší koncentra ní ád). Závislost I_p na koncentraci TUDCA není lineární v celém m eném koncentra ním rozmezí, ale pouze v rozmezí hodnot $6 \cdot 10^{67}$ a $1 \cdot 10^{65} \text{ mol.l}^{61}$, jak je vid t na grafu kalibra ní závislosti (obr. 14). Z obr. 15 je z ejmé, že v obdobném rozmezí koncentrací $6 \cdot 10^{67}$ a $4 \cdot 10^{66} \text{ mol.l}^{61}$ se potenciál píku E_p posouvá výrazn do negativn jích hodnot stejn jako u metody DP polarografie; celkový posun je asi 140 mV. Parametry kalibra ních p ímek pro lineární závislosti jsou uvedeny v tab. 6, kde je uvedena i mez detekce a mez stanovitelnosti. Oproti metod DPP je mez detekce a mez stanovitelnosti pro DPV o ád nížší, tj. ádov $10^{67} \text{ mol.l}^{61}$. Nejnižší m ítelná koncentrace byla $6 \cdot 10^{67} \text{ mol.l}^{61}$, opakovatelnost vyjád ená sm rodatnou odchylkou s byla 0,7062 ($n = 10$).



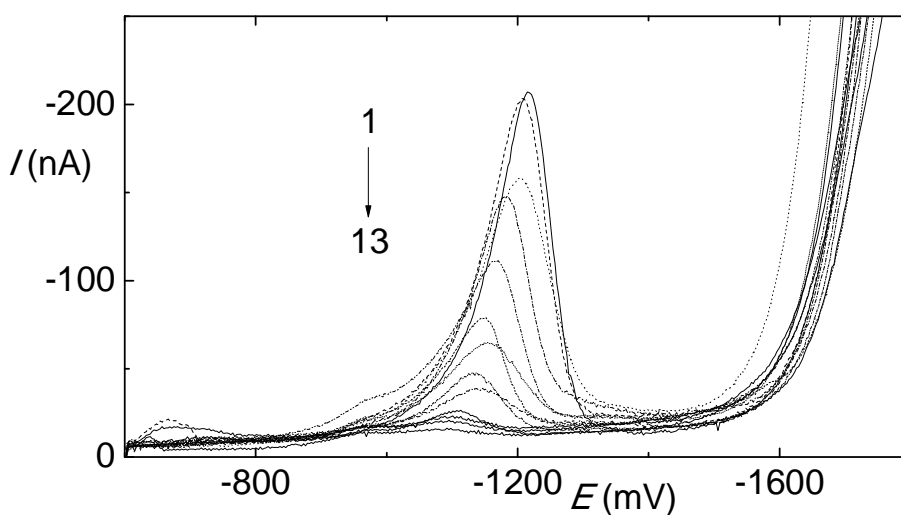
Obr. 11

DP voltamogramy TUDCA ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) v prost edí (A) BR pufr o pH (1) 3,0; (2) 4,0; (3) 5,0; (4) 9,0; (5) 12,0; a v prost edí (B): (1) 0,1 mol.l⁻¹ fosfátový pufr o pH = 7,1; (2) 0,1 mol.l⁻¹ octanový pufr o pH = 4,4; (3) BR pufr o pH = 9,0; (4) 0,04 mol.l⁻¹ borátový pufr o pH = 9,1.

Tab. 5

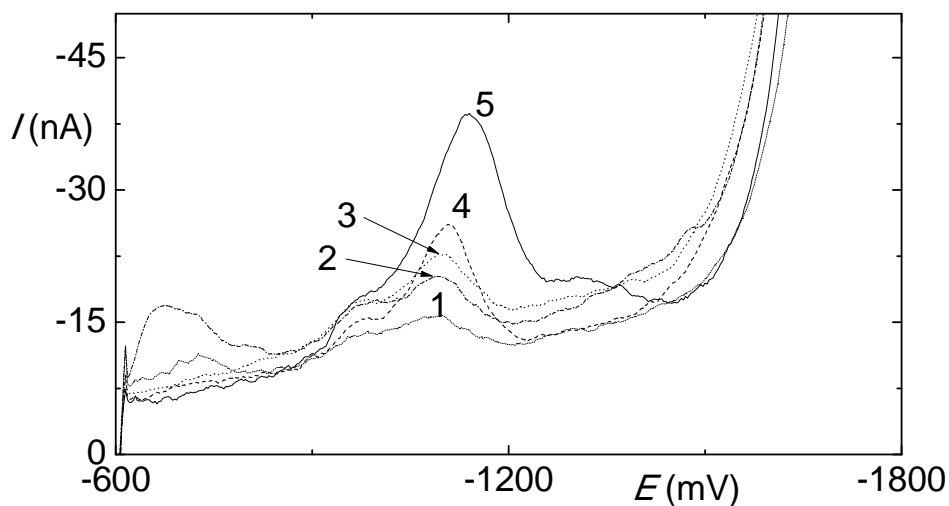
Vliv pH a složení pufru na výšku píku I_p a potenciál píku E_p TUDCA ($c = 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$), měřeno metodou DP voltametrie.

pufr	pH	I_p (nA)	E_p (mV)
0,04 mol.l ⁻¹ borátový pufr	9,1	6197,1	61218
0,1 mol.l ⁻¹ fosfátový pufr	7,1	6204,7	61214
0,1 mol.l ⁻¹ octanový pufr	4,4	6193,0	61221
BR pufr	4,0	6231,0	61227
BR pufr	5,0	6213,5	61214
BR pufr	9,0	6200,4	61214
BR pufr	12,0	6198,0	61214



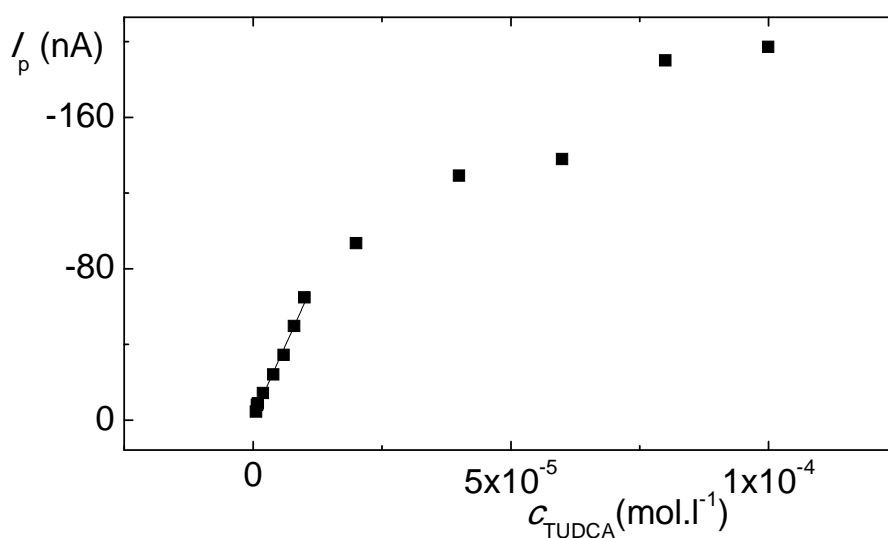
Obr. 12

DP voltamogramy TUDCA v rozmezí koncentrací $1 \cdot 10^{-6}$ až $6 \cdot 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$, měřené v $0,04 \text{ mol.l}^{-1}$ borátovém pufru o $\text{pH} = 9,1$. Koncentrace (mol.l^{-1}): (1) $1 \cdot 10^{-6}$; (2) $8 \cdot 10^{-6}$; (3) $6 \cdot 10^{-5}$; (4) $4 \cdot 10^{-5}$; (5) $2 \cdot 10^{-5}$; (6) $1 \cdot 10^{-5}$; (7) $8 \cdot 10^{-6}$; (8) $6 \cdot 10^{-6}$; (9) $4 \cdot 10^{-6}$; (10) $2 \cdot 10^{-6}$; (11) $1 \cdot 10^{-6}$; (12) $8 \cdot 10^{-7}$; (13) $6 \cdot 10^{-7}$.



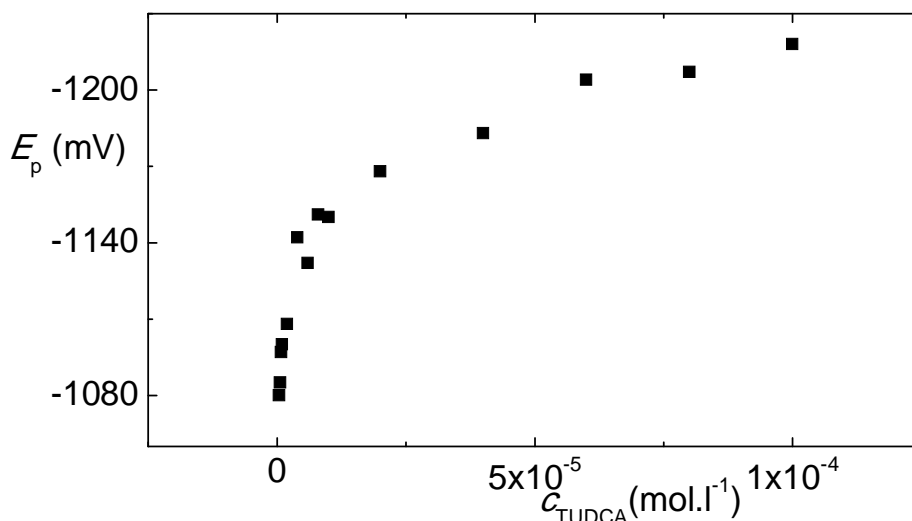
Obr. 13

DP voltamogramy TUDCA v rozmezí koncentrací $4 \cdot 10^{66}$ až $6 \cdot 10^{67} \text{ mol.l}^{61}$, měně v $0,04 \text{ mol.l}^{61}$ borátovém pufru o $\text{pH} = 9,1$. Nejníř m ěně koncentrace (mol.l^{61}): (1) $6 \cdot 10^{67}$; (2) $8 \cdot 10^{67}$; (3) $1 \cdot 10^{66}$; (4) $2 \cdot 10^{66}$; (5) $4 \cdot 10^{66}$



Obr. 14

Závislost vý-ky píku I_p na koncentraci TUDCA v rozmezí koncentrací $1 \cdot 10^{64}$ až $6 \cdot 10^{67} \text{ mol.l}^{61}$, měně metodou DP voltametrie v prost ědí $0,04 \text{ mol.l}^{61}$ borátového pufru o $\text{pH} = 9,1$.



Obr. 15

Závislost potenciálu píku E_p na koncentraci TUDCA v rozmezí $1 \cdot 10^{-6}$ až $6 \cdot 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$, měřená metodou DP voltametrie v prostředí $0,04 \text{ mol.l}^{-1}$ borátového pufru o $\text{pH} = 9,1$.

Tab. 6

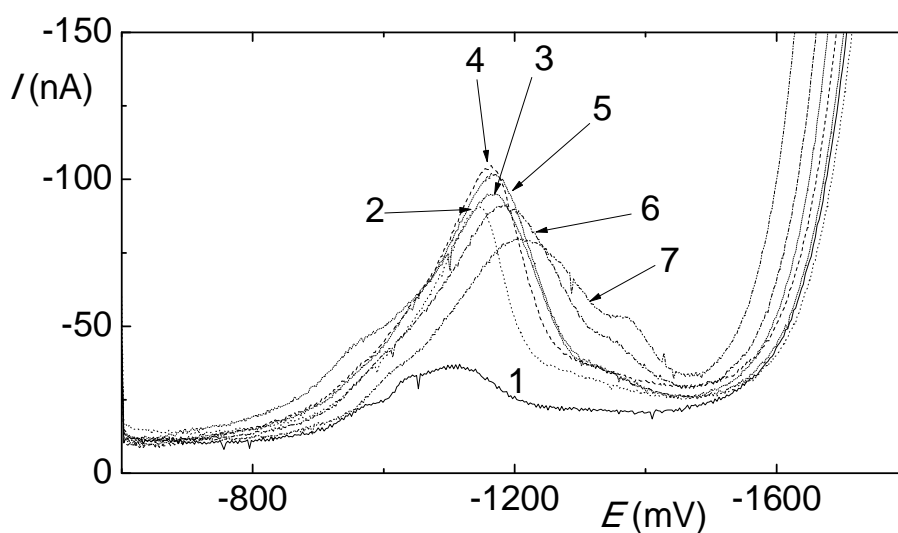
Parametry kalibrační přímky TUDCA v rozmezí koncentrací $6 \cdot 10^{-7}$ až $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ v prostředí $0,04 \text{ mol.l}^{-1}$ borátového pufru o $\text{pH} = 9,1$ měřené metodou DP voltametrie a hodnoty meze detekce (LOD) a meze stanovitelnosti (LOQ).

úsek (nA)	smloucnice (nA.l.mol ⁻¹)	korelační koeficient	LOD (mol.l ⁻¹)	LOQ (mol.l ⁻¹)
$0,15 \pm 1,2$	$(66,05 \pm 0,22) \cdot 10^6$	0,9960	$2,96 \cdot 10^{-7}$	$9,87 \cdot 10^{-7}$

3.3 Adsorpční rozpouštěcí diferenční pulsní voltametrie TUDCA

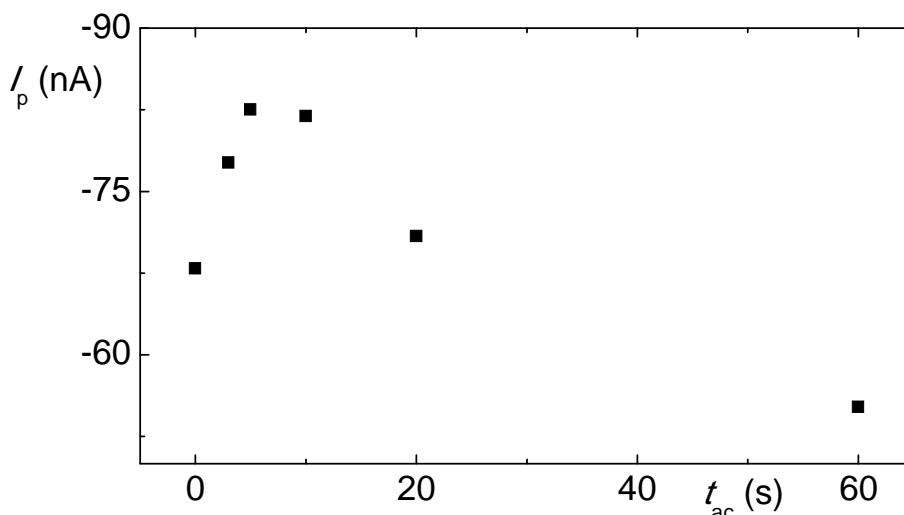
Vzhledem k předpokládané adsorpci na povrch elektrody byla dále studována možnost využití adsorpční rozpouštěcí diferenční pulsní voltametrie pro stanovení nízkých koncentrací TUDCA. Nejprve byl studován vliv času a potenciálu akumulace na výšku píku I_p TUDCA ($1 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$) v $0,04 \text{ mol.l}^{-1}$ borátovém pufru o $\text{pH} = 9,1$.

Potenciál akumulace byl nastaven na $-0,850$ mV, tj. potenciál t_{ac} před nástupem píku TUDCA (viz obr. 16). Nastavené t_{ac} akumulace při potenciálu $-0,850$ mV byly v rozmezí 0 až 60 sekund. K tomuto času je ovšem ještě potřeba přičíst dobu, po kterou se roztok před vlastním DP scanem ustaluje (5 s) a dobu, při které již probíhá DP scan, ale ještě nedochází k redukci TUDCA. Tato doba činila, při rychlosti polarizace 20 mV.s^{-1} a po přechodu ním potenciálu $-0,600$ mV, 12,5 s. Celkový čas do nástupu píku TUDCA byl tedy v rozmezí od 17,5 do 87,5 sekundy. Výška píku I_p s rostoucím časem akumulace nejprve nelineárně roste s maximem při době akumulace 5 sekund a poté klesá (obr. 17). Zároveň dochází s rostoucí dobou akumulace t_{ac} k posunu hodnot potenciálu píku o cca -60 mV do katodické oblasti. Vzhledem k malému nárůstu proudu píku I_p a rychlé adsorpci studované látky je tato metoda z analytického hlediska nevyužitelná. Při delších časech dochází k poklesu proudu píku I_p , jelikož se látka desorbuje na úkor neistoty z roztoku.



Obr. 16

AdS-DP voltamogramy TUDCA ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$) v prostředí $0,04 \text{ mol.l}^{-1}$ borátového pufru o $\text{pH} = 9,1$ (základní elektrolyt bez akumulace (1)) a potenciálu akumulace $-0,850$ mV po dobu akumulace t_{ac} ; (2) 0 s; (3) 3 s; (4) 5 s; (5) 10 s; (6) 20 s; (7) 60 s.



Obr. 17

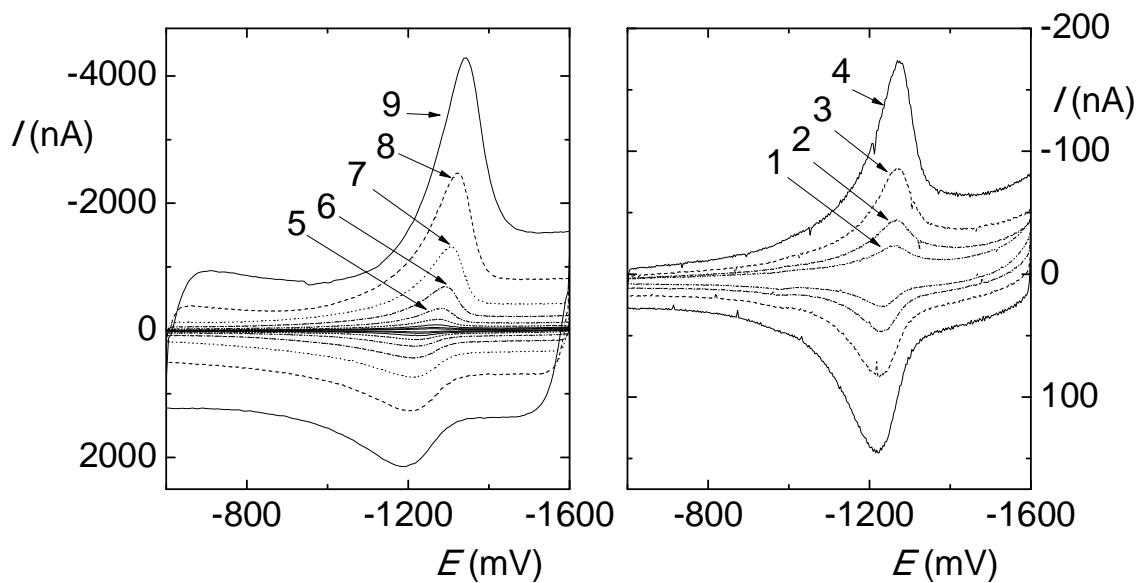
Závislost výšky píku I_p TUDCA ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$) na době akumulace t_{ac} při potenciálu akumulace $-0,850 \text{ V}$, měřená metodou AdS-DP voltametrie v prostředí $0,04 \text{ mol.l}^{-1}$ borátového pufru o $\text{pH} = 9,1$.

3.4 Charakteristika elektrodového děje

3.4.1 Cyklická voltametrie TUDCA

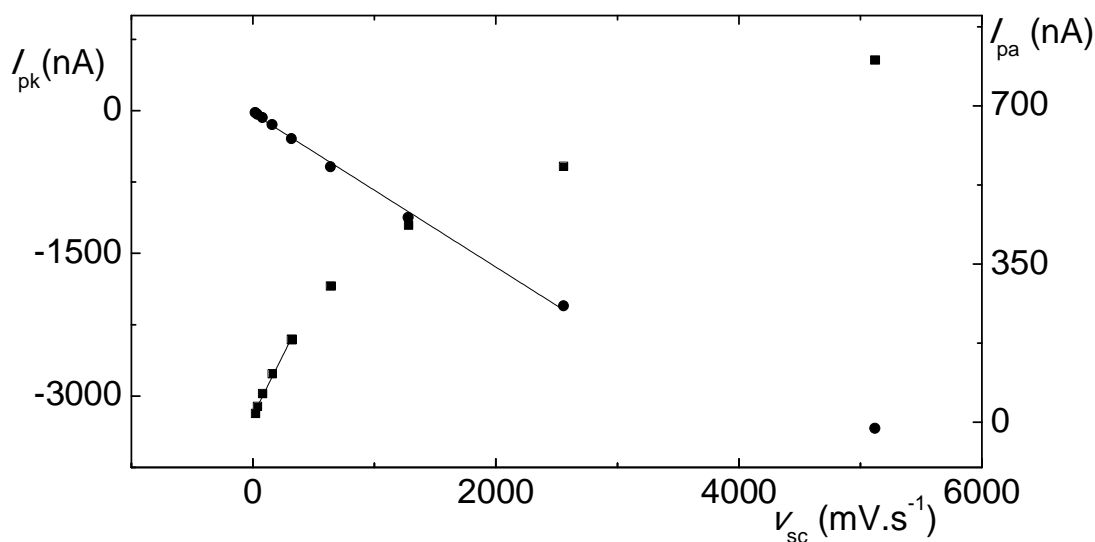
Pro charakterizaci elektrochemické redukce TUDCA byla provedena cyklická voltametrie v prostředí $0,04 \text{ mol.l}^{-1}$ borátového pufru o $\text{pH} = 9,1$, rychlostí polarizace od 20 mV.s^{-1} do 5620 mV.s^{-1} . Látka poskytuje ostrý katodický pík a ostrý anodický pík při zpětném scanu (viz cyklické voltamogramy na obr. 18). Tento výrazný, nikoliv sigmoidální tvar píku naznačuje, že děj probíhající na elektrodě je řízen adsorpcí a viditelný pík v anodické oblasti ukazuje na quasi-reverzibilní děj. Závislosti výšek píků I_{pK} v katodické i I_{pA} anodické oblasti a závislosti jejich potenciálu (E_{pK} a E_{pA}) na rychlosti polarizace jsou zobrazeny na obr. 19 a obr. 20. Potenciál píku v katodické oblasti se se zvyšující rychlostí scanu posunuje do oblastí zápornějších potenciálů v rozsahu ca 80 mV ; v anodické oblasti se naopak se zvyšující se rychlostí scanu pík posunuje do kladnějších potenciálů, přičemž celkový posun je ca 40 mV (obr. 20). Na obr. 19 můžeme vidět, že výška píku lineárně stoupá v rozmezí rychlostí scanu od

20 mV.s^{-1} do 2560 mV.s^{-1} v katodické oblasti a v anodické oblasti od 20 mV.s^{-1} do 320 mV.s^{-1} ; tato lineární závislost i při nízkých rychlostech scanu je důkazem elektrodového děje řízeného adsorpcí. Parametry p ímek jsou uvedeny v tab. 7.



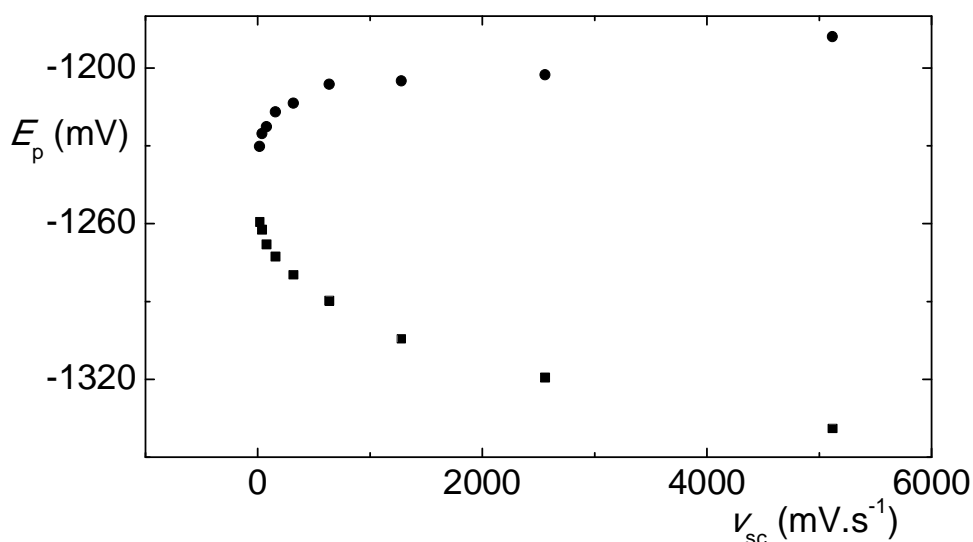
Obr. 18

Cyklické voltamogramy TUDCA ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) měřené v prostředí 0,04 mol.l^{-1} borátového pufru o $\text{pH} = 9,1$. Rychlost polarizace: (1) 20 mV.s^{-1} ; (2) 40 mV.s^{-1} ; (3) 80 mV.s^{-1} ; (4) 160 mV.s^{-1} ; (5) 320 mV.s^{-1} ; (6) 640 mV.s^{-1} ; (7) 1280 mV.s^{-1} ; (8) 2560 mV.s^{-1} ; (9) 5120 mV.s^{-1}



Obr. 19

Závislost výšky píku TUDCA ($c = 1.10^{64} \text{ mol.l}^{-1}$) v katodické (I_{pK}) a anodické (I_{pA}) oblasti na rychlosti skenu v_{sc} v rozmezí rychlostí 20 mV.s^{-1} až 5120 mV.s^{-1} , měně metodou cyklické voltametrie v prostředí $0,04 \text{ mol.l}^{-1}$ borátového pufru o $\text{pH} = 9,1$. () Výška píku v katodické oblasti I_{pK} ; () Výška píku v anodické oblasti I_{pA} .



Obr. 20

Závislost potenciálu píku E_p TUDCA ($c = 1.10^{64} \text{ mol.l}^{-1}$) v katodické a anodické oblasti na rychlosti skenu v_{sc} v rozmezí rychlostí 20 mV.s^{-1} až 5120 mV.s^{-1} , měně metodou cyklické voltametrie v prostředí $0,04 \text{ mol.l}^{-1}$ borátového pufru o $\text{pH} = 9,1$. () Potenciál píku v anodické oblasti; () Potenciál píku v katodické oblasti.

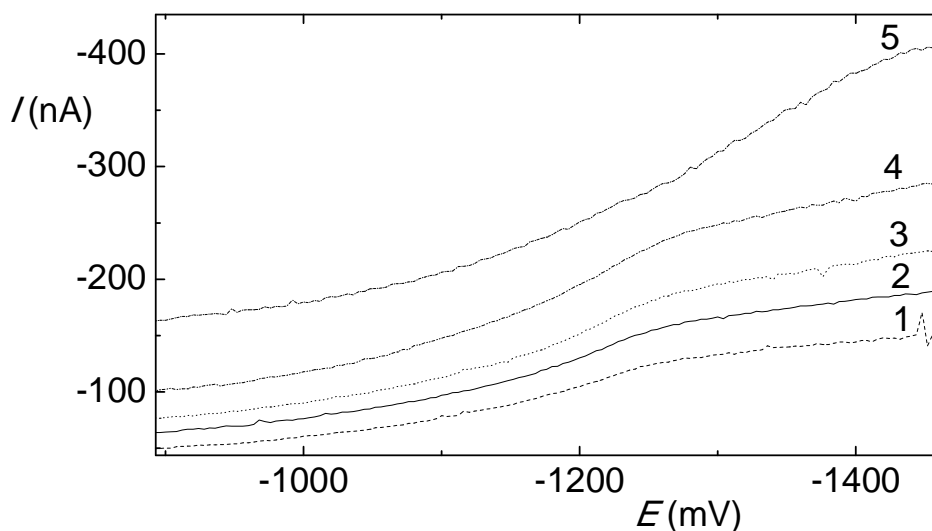
Tab. 7

Parametry p ímek pro závislosti vý-ek píku (I_{pK} , I_{pA}) TUDCA v prost edí $0,04 \text{ mol.l}^{-1}$ borátového pufru o $\text{pH} = 9,1$, na rychlosti skenu v_{sc} .

závislost	$v_{sc} \text{ (mV.s}^{-1}\text{)}$	úsek (nA)	sm rnice (nA.l.mol^{-1})	korela ní koeficient
I_{pK} na v_{sc}	20 - 2560	$628,7 \pm 17,6$	$60,8 \pm 0,02$	0,9986
I_{pA} na v_{sc}	20 - 320	$14,9 \pm 4,5$	$0,54 \pm 0,03$	0,9963

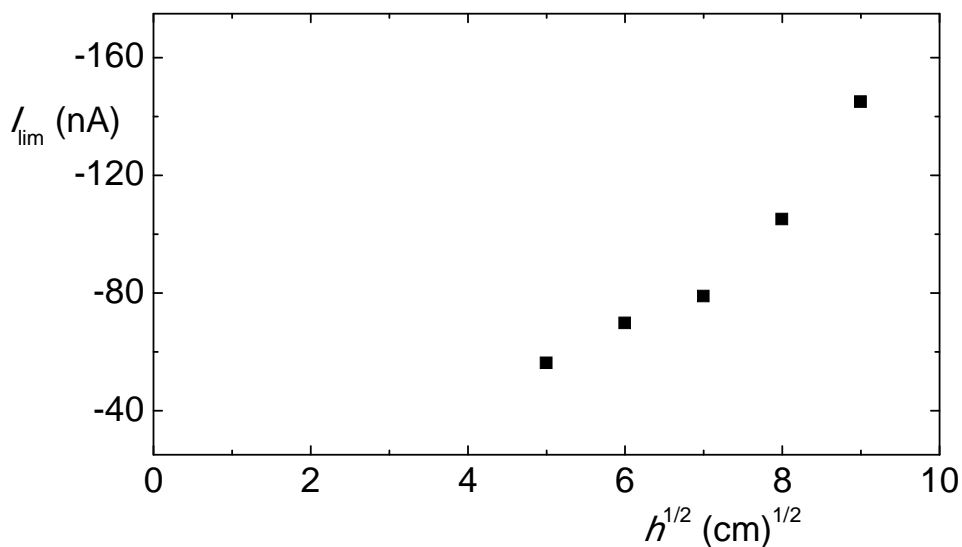
3.4.2 Charakter limitních proud v DC test polarografii

Dále byla provedena DC test polarografie roztoku TUDCA ($c = 1.10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) v prost edí $0,04 \text{ mol.l}^{-1}$ borátového pufru o $\text{pH} = 9,1$ za ú elem zjistit, o jaký charakter pozorovaných limitních proud se jedná (obr. 21). Nelineární charakter závislosti limitního proudu na odmocnin z vý-ky rtu ového rezervoáru zna í, že se nejedná o d j kontrolovaný difusí, což podporuje výsledky získané metodou cyklické voltametrie (obr. 22).



Obr. 21

DC test polarogramy pro TUDCA ($c = 1.10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$) pro vý-ky rtu ového sloupce (1) 25 cm; (2) 36 cm; (3) 49 cm; (4) 64 cm; (5) 81 cm.



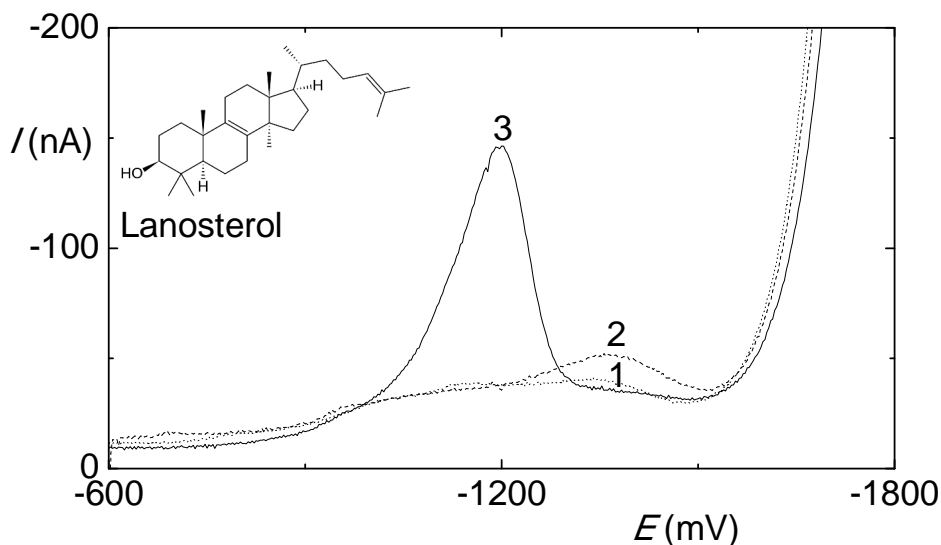
Obr. 22

Závislost limitního proudu I_{lim} TUDCA ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$), měřená DC metodou polarografií, na odmocnině z výšky rtuového sloupce rezervoáru v prostředí $0,04 \text{ mol.l}^{-1}$ borátového pufru o $\text{pH} = 9,1$.

3.4.3 Porovnání elektrochemické redukce TUDCA a lanosterolu

Mechanismus elektrochemické redukce TUDCA ani dalších fluových kyselin nebyl dosud studován. Lze předpokládat úast protonu karboxylové i sulfonové skupiny při elektroredukci [9]. DP voltamogramy TUDCA byly proto porovnány s DP voltamogramy lanosterolu, který je TUDCA strukturně podobný, ale nemá navázanu sulfonovou skupinu (viz struktura v obr. 23). Jako základní elektrolyt byla použita směs methanolu a $0,04 \text{ mol.l}^{-1}$ borátového pufru o $\text{pH} = 9,1$ (1:9) vzhledem k omezené rozpustnosti lanosterolu ve vodě. Nicméně i v přítomnosti methanolu se lanosterol vysrážel z roztoku v bílou vlokovitou sraženinu, tudíž nelze odhadnout, jaká koncentrace lanosterolu v roztoku přesně byla. Na obr. 23 jsou naměřené voltamogramy roztoků základního elektrolytu, TUDCA a lanosterolu. Výška píku roztoku TUDCA je $0,125 \pm 2 \text{ nA}$ a její potenciál $0,1195 \pm 5 \text{ mV}$. V této oblasti lanosterol neposkytuje žádný redukční pík, i když to může být způsobeno jeho nízkou koncentrací v roztoku. Obdobně byly proměřeny i roztoky TUDCA a lanosterolu s vyšším obsahem methanolu ve směsi methanol - $0,04 \text{ mol.l}^{-1}$ borátový pufr o $\text{pH} = 9,1$ (1:1), nicméně v tomto

prostředí se lanosterol opět vysrážel a vyšší koncentrace methanolu způsobila potlačení píku TUDCA.



Obr. 23

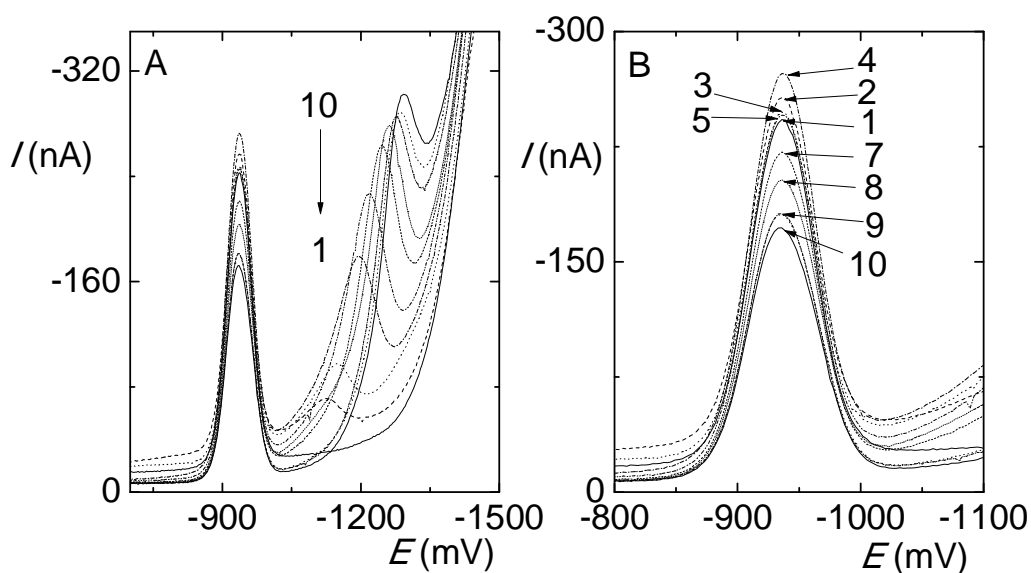
DP voltamogramy TUDCA ($c = 1 \cdot 10^{-6}$ mol.l⁻¹), lanosterolu ($c = 1 \cdot 10^{-6}$ mol.l⁻¹) a základního elektrolytu (0,04 mol.l⁻¹ borátový pufr- methanol (9:1)). (1) základní elektrolyt; (2) lanosterol; (3) TUDCA.

3.4.4 Studium vlivu přítomnosti Zn^{2+} na stanovení TUDCA

V oblasti vysoce negativních potenciálů, ve kterých dochází k redukci TUDCA, je redukován možný interferent Zn^{2+} , který se nachází ve fyziologických tkáních a v množství odpovídající 50 μ g na gram suché tkáně [15]. Ke zjištění, zda signál TUDCA interferuje se signálem Zn^{2+} , byla použita metoda DP voltametrie v prostředí BR pufru o pH = 5,0. Ověření nezávislosti stanovení Zn^{2+} a TUDCA bylo provedeno měřením samostatných roztoků Zn^{2+} ($c = 1 \cdot 10^{-5}$ mol.l⁻¹) a TUDCA ($c = 2 \cdot 10^{-5}$ mol.l⁻¹) v prostředí BR pufru o pH = 5,0 a společného roztoku za stejných koncentrací a podmínek. DP voltamogramy pro tyto roztoky jsou na obr. 28 a můžeme na nich vidět, že přítomnost Zn^{2+} nemá nijak výrazný vliv na DP voltamogramy TUDCA. Potenciál redukce Zn^{2+} byl při tomto měření ca. -0,935 V, pro pík TUDCA měl potenciál píku hodnotu ca. -1,157 V. Výška píku Zn^{2+} dosahovala hodnoty 0,175 nA a výška píku

TUDCA 683 nA. Tyto hodnoty platí pro výše zmíněné roztoky.

Jako další problém měření roztoku Zn^{2+} o koncentraci $1 \cdot 10^{-65} \text{ mol.l}^{-1}$, do kterého byly postupně přidávány standardní dávky roztoku TUDCA o koncentraci $1 \cdot 10^{-64} \text{ mol.l}^{-1}$, metodou DP voltametrie v prostředí BR pufru o $\text{pH} = 5,0$. Změny koncentrací Zn^{2+} a TUDCA v závislosti na velikosti dávky jsou zřejmé z tab. 8. Z naměřených voltamogramů na obr. 24 můžeme vidět, že Zn^{2+} poskytuje jeden pík při potenciálu ca. -936 mV. Na obr. 25 můžeme vidět chování výšky píku $I_{\text{Zn}^{2+}}$ se snižující se koncentrací Zn^{2+} . Se zvyšující se koncentrací TUDCA roste i její výška píku I_{TUDCA} (obr. 26) a zároveň se pík posouvá k zápornějším potenciálům v rozmezí $-1209 \pm 80 \text{ mV}$ (obr. 27), což je v souladu s předchozími měřeními metodou DP voltametrie.



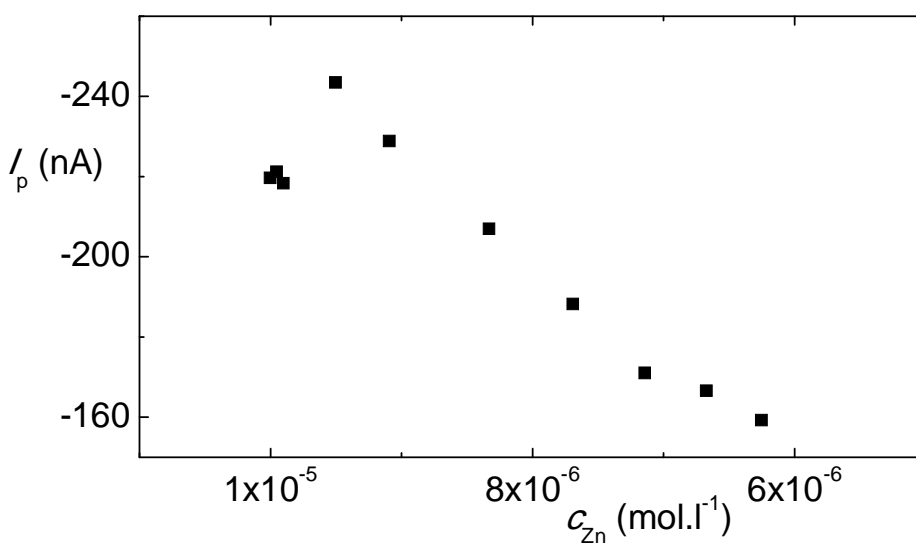
Obr. 24

DP voltamogramy roztoku Zn^{2+} ($c = 1 \cdot 10^{-65} \text{ mol.l}^{-1}$) s přidávkou TUDCA ($c = 1 \cdot 10^{-64} \text{ mol.l}^{-1}$) v prostředí BR pufru o $\text{pH} = 5,0$. Celkový přírůstek TUDCA (l): (1) 0; (2) 50; (3) 100; (4) 500; (5) 1000; (6) 2000; (7) 3000; (8) 4000; (9) 5000; (10) 6000.

Tab.8

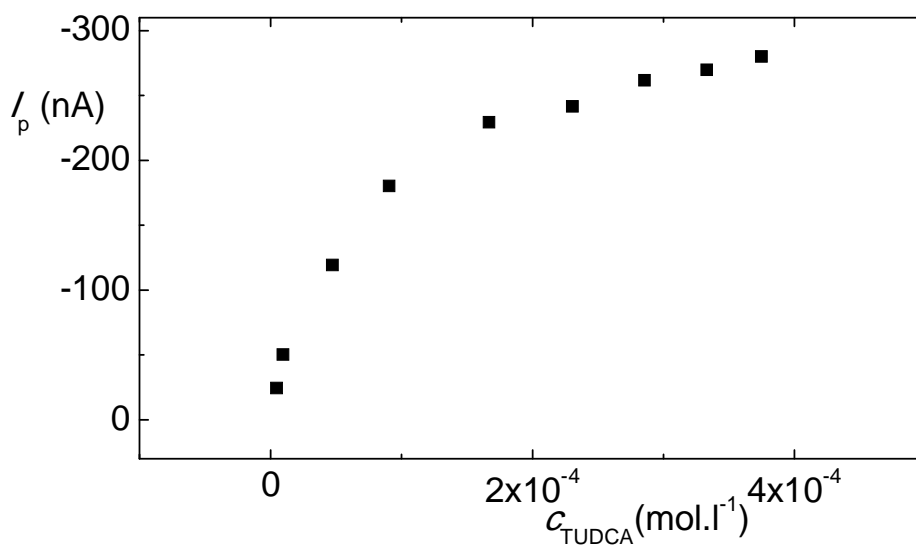
Zm na koncentrace Zn^{2+} a TUDCA v roztoku v závislosti na objemu standardního p ídavku TUDCA ($c = 1.10^{64} \text{ mol.l}^{61}$).

$c_{\text{Zn}^{2+}} (\text{mol.l}^{61})$	$c_{\text{TUDCA}} (\text{mol.l}^{61})$	$V_{\text{TUDCA}} (\mu\text{l})$
0,00001	-	0
0,00000995	0,00000498	50
0,0000099	0,0000099	100
0,0000095	0,0000476	500
0,00000909	0,0000909	1000
0,00000833	0,000167	2000
0,00000769	0,0002307	3000
0,00000714	0,0002857	4000
0,00000667	0,0003333	5000
0,00000625	0,000375	6000



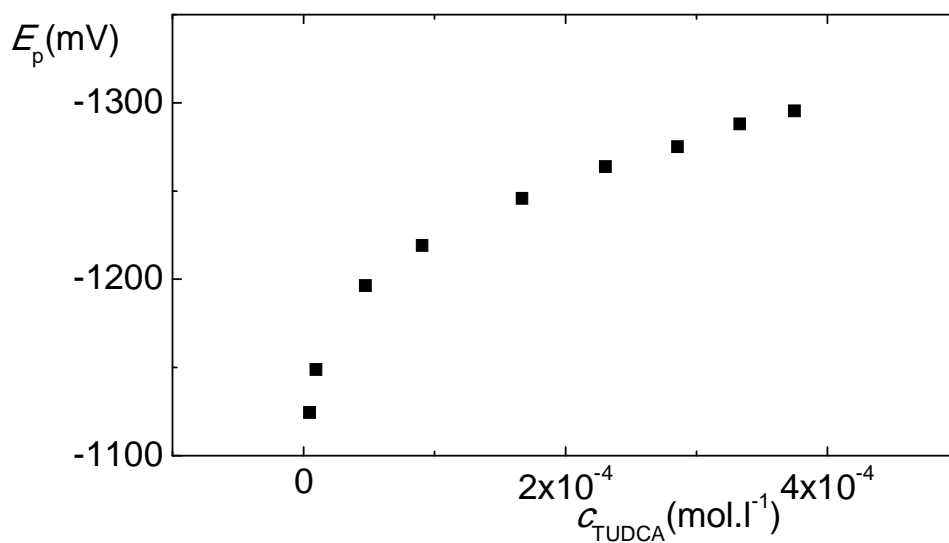
Obr. 25

Koncentra ní závislost vý-ky píku $I_{p\text{Zn}^{2+}}$ v rozmezí koncentrací Zn^{2+} 1.10^{65} a $6,25.10^{66} \text{ mol.l}^{61}$, m ená metodou DP voltametrie v prost edí BR pufru o $\text{pH} = 5,0$ a s odpovídající koncentrací TUDCA v rozmezí koncentrací 0 a $3,75.10^{64} \text{ mol.l}^{61}$ dle tab. 8.



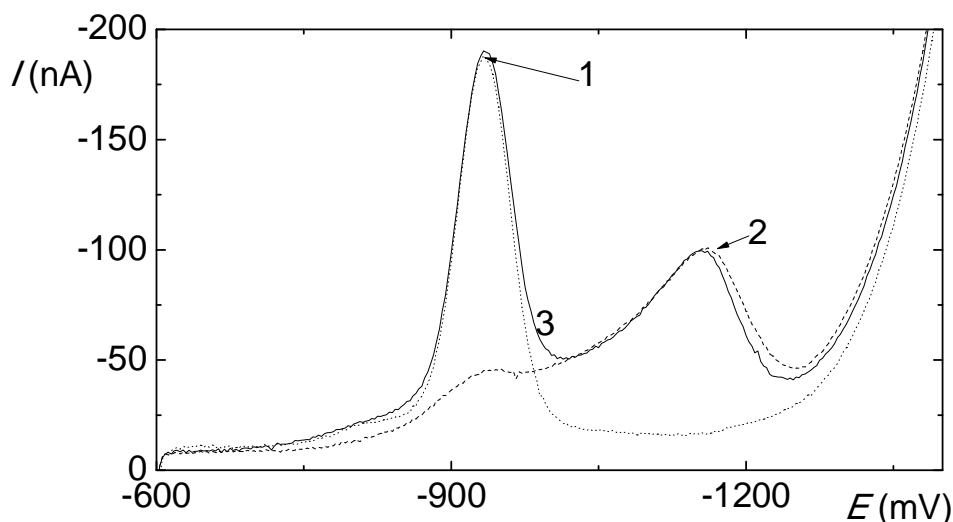
Obr. 26

Koncentra n í závislost vý-ky píku I_p TUDCA v rozmezí koncentrací 0 a $3,75 \cdot 10^{64} \text{ mol.l}^{61}$, m ená metodou DP voltamentrie v prost edí BR pufru o $\text{pH} = 5,0$ a Zn^{2+} v rozmezí koncentrací $1 \cdot 10^{65}$ a $6,25 \cdot 10^{66} \text{ mol.l}^{61}$ dle tab. 8.



Obr. 27

Závislost potenciálu píku E_p TUDCA na koncentraci v rozmezí 0 a $3,75 \cdot 10^{64} \text{ mol.l}^{61}$, m ená metodou DP voltametrie v prost edí $0,04 \text{ mol.l}^{61}$ borátového pufru o $\text{pH} = 9,1$.



Obr. 28

DP voltamogramy roztok (1) TUDCA ($c = 2 \cdot 10^{65} \text{ mol.l}^{-1}$); (2) Zn^{2+} ($c = 1 \cdot 10^{65} \text{ mol.l}^{-1}$); (3) Zn^{2+} ($c = 1 \cdot 10^{65} \text{ mol.l}^{-1}$) a TUDCA ($c = 2 \cdot 10^{65} \text{ mol.l}^{-1}$) měně v prostředí BR pufru o $\text{pH} = 5,0$.

4. Závěr

Pro studium elektrochemické redukce TUDCA byly použity metody DPV, AdS-DPV na visící rtuové kapkové elektrodě a DPP a DCTP na rtuové kapkové elektrodě. Vzhledem ke skutečnosti, že TUDCA je kyselina s nízkou hodnotou $\text{pK}_a = 1,5$ a to díky přítomnosti sulfonové skupiny, která je součástí taurinu, který je součástí této kyseliny, se v roztoku o $\text{pH} = 9,1$ TUDCA vyskytuje prakticky nedisociovaná.

Pro všechny metody bylo zjištěno, že elektrochemická redukce probíhá v jednom kroku v oblasti vysoce záporných potenciálů, který není výrazně ovlivněn pH studovaného roztoku a jeho složením. Potenciál píku se s rostoucí koncentrací posouvá do oblasti negativních potenciálů, což svědčí o adsorpci studované látky na povrch elektrody. Nejcitlivější z provedených metod je metoda diferenční pulsní voltametrie, která má nižší mez detekce i mez stanovitelnosti ($\text{LOD} = 2,96 \cdot 10^{67} \text{ mol.l}^{-1}$; $\text{LOQ} = 9,87 \cdot 10^{67} \text{ mol.l}^{-1}$) než diferenční pulsní polarografie ($\text{LOD} = 3,17 \cdot 10^{66} \text{ mol.l}^{-1}$; $\text{LOQ} = 1,05 \cdot 10^{65} \text{ mol.l}^{-1}$) a voltametrické křivky jsou lépe vyhodnotitelné než křivky polarografické. Nevýhodou této metody je, že se provádí na visící rtuové kapkové

elektrod , která je oproti rtu ové kapající elektrod mnohem více poruchová a kalibrace nové elektrody je asov pom rn náro ná.

Z provedených m ení pro charakteristiku elektrodového d je bylo zji-t no, že d je odehrávající se v roztoku na elektrod jsou quasi-reverzibilní, kontrolované adsorpcí a pravd podobn je redukován proton sulfonové skupiny. Zárove z t chto m ení plyne, že stanovení TUDCA není ovlivn no p ítomností Zn^{2+} iont .

5. Literatura

- [1] Boatright J. H., Nickerson J. M., Moring A. G. and Pardue M.: Bile Acids in Treatment of Ocular Disease. *Journal of Ocular Biology, Diseases and Informatics* (2009) 2, 149-159
- [2] Keene C. D., Rodrigues C. M. P., Eich T., Chhabra M. S., Steer C. J. and Low W. C.: Tauroursodeoxycholic, a Bile Acid, is Neuroprotective in Transgenic Animal Model of Huntington Disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, (2002) 99, 10671-10676
- [3] Duan W. M., Rodrigues C. M., Zhao L. R., Steer C. J., Low W. C.: Tauroursodeoxycholic Acid Improves the Survival and Function of Nigral Transplants in a Rat Model of Parkinson's Disease. *Cell Transplantation* (2002) 11, 195-205
- [4] Fernández-Sánchez L., Lax P., Pinilla I., Martín-Nieto J., Cuenca N.: Tauroursodeoxycholic Acid Prevents Retinal Degradation in Transgenic P23H Rats. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* (2011) 52, 4998-5008.
- [5] Pecková K., Nesm rák K: Electrochemistry of Bile Acids, Cholesterol, and Related Compounds Sensing in Electroanalysis (Kalcher K., Metelka R, TMancara I., Vyt as K., eds.). University Press Centre, University of Pardubice (2012) 7, 87-96.
- [6] Feroci G., Roda A., Fini A.: Study of the Interaction between Oxygen and Bile Salts, *Bioelectrochemistry* (2007) 70, 524-531.

- [7] Huxtable R. J.: Physiological actions of Taurine. *Physiological reviews* (1992) 72, 101-163
- [8] Jacobsen J. G., Smith L. H. : *Biochemistry and Physiology of Taurine and Taurine Derivatives*. *Physiological Reviews*, (1968) 48, 424-511
- [9] Ferri T., Campanella L., De Angelis G.: Differential-Pulse Polarographic Determination of Cholic Acid. *Analyst* (1984) 109, 923-925:
- [10] Ganesan M., Nanjundan, S., Viswanathan S., Uma G.: Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry for the Simultaneous Determination of Ursodiol and its Major Metabolites, Tauroursodeoxycholic Acid and Glycoursodeoxycholic Acid in Human Plasma. *E-journal of Chemistry* (2012) 9, 1605-1612
- [11] Barek J., Opekar F., TMulík K.: *Elektroanalytická chemie*, Univerzita Karlova v Praze, Karolinum 2005, Praha
- [12] Opekar F., Jelínek I., Rychlovský P., Plzák Z.: *Základní analytická chemie* Univerzita Karlova v Praze, Karolinum 2003, Praha
- [13] Settle F. A. (editor), Konnaves S. P. (Tufts University): *Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry*, chapter 37 Voltammetric Techniques. Prentice-Hall, Inc, 1997, New Jersey
- [14] Kalvoda R., Kopanica M.: Adsorptive Stripping Voltammetry in Trace Analysis, *Pure and Applied Chemistry*, (1989) 61, 97-112
- [15] Fini A., Feroci G., Fazio F., Zuman P.: Interaction of Iron (II) with Bile Salts, *Journal of Inorganic Biochemistry*, (1997) 68, 251-256.